

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDO GARRIDO DE OLIVEIRA

BIOMONITORAMENTO DO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC,
UTILIZANDO A ESPÉCIE DE PEIXE *Geophagus brasiliensis*.

CURITIBA

2018

FERNANDO GARRIDO DE OLIVEIRA

BIOMONITORAMENTO DO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC,
UTILIZANDO A ESPÉCIE DE PEIXE *Geophagus brasiliensis*.

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Ecologia e Conservação.

Orientadora: Prof^a. Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis

CURITIBA

2018

Universidade Federal do Paraná. Sistema de Bibliotecas.
Biblioteca de Ciências Biológicas.
(Telma Terezinha Stresser de Assis –CRB/9-944)

Oliveira, Fernando Garrido de
Biomonitoramento do Rio Perequê, Porto Belo – SC, utilizando a espécie
de peixe *Geophagus brasiliensis*. / Fernando Garrido de Oliveira. – Curitiba,
2018.

88 p.: il. ; 30cm.

Orientadora: Helena Cristina da Silva de Assis
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Conservação.

1. Biomarcadores. 2. Peixe. 3. Qualidade ambiental. I. Título II. Assis,
Helena Cristina da Silva de. III. Universidade Federal do Paraná. Setor de
Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ecologia e
Conservação.

CDD (20. ed.) 628.16

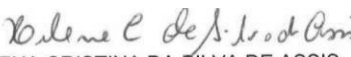


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ECOLOGIA E
CONSERVAÇÃO

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ECOLOGIA E CONSERVAÇÃO da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de FERNANDO GARRIDO DE OLIVEIRA intitulada: BIOMONITORAMENTO DO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO - SC, UTILIZANDO A ESPÉCIE DE PEIXE *Geophagus brasiliensis*, após terem inquirido o aluno e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa. A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

Curitiba, 26 de Fevereiro de 2018.


HELENA CRISTINA DA SILVA DE ASSIS

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)



ANA TEREZA BITENCOURT GUIMARÃES
Avaliador Externo (UNIOESTE)



MARITANA MELA PRODOCIMO
Avaliador Interno (UFPR)

AGRADECIMENTOS

À Deus que tem sido minha fortaleza nesta caminhada chamada vida.

À minha mãe Maria.

À minha orientadora, Prof.^a Dr.^a Helena Cristina da Silva de Assis, pela confiança, orientação e amizade.

Ao Curso de Pós-Graduação em Ecologia e Conservação, do Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Aos colegas do Laboratório de Toxicologia Ambiental Lilian, Franciele, Sabrina, Maiara Perusolo, Maira Vicentini, Cris e a Letícia pela amizade e apoio.

Às minhas amigas e colegas de profissão Letícia Teive e Aline Dias pela colaboração na execução deste trabalho.

Aos Professores Dr.^a Maritana Mela, Dr. André Padial, Dr.^a Ana Teresa e a minha amiga Juliana Roratt pelo auxílio nas análises.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente influenciaram no desenvolvimento deste trabalho e crescimento pessoal.

A Capes pelo apoio financeiro.

Muito obrigado!

“Afinal, quanto maior o saber, maior o sofrimento; e quanto maior o conhecimento, maior o desgosto.”

Eclesiastes 1:18

RESUMO

Os ecossistemas aquáticos, em especial os de água doce podem prover serviços únicos e imprescindíveis para as diversas atividades sociais, sejam elas de origem doméstica, industrial, agrícola ou comercial. A agricultura em especial tem contribuído de forma significativa para a contaminação dos ecossistemas, devido ao uso intensivo de agrotóxicos. Dentre os principais impactos ambientais decorrentes da rizicultura estão a redução da quantidade e qualidade da água devido a processos de eutrofização e uso de agrotóxicos. Este estudo objetivou analisar a qualidade da água do Rio Perequê, Porto Belo, Santa Catarina, Brasil, por meio da quantificação química de herbicidas utilizados na rizicultura e da análise de biomarcadores na espécie de peixe nativa *Geophagus brasiliensis*. Duas coletas foram realizadas no Rio Perequê, a primeira coleta (C1) no mês de Novembro de 2016, na estação da primavera e a segunda coleta (C2), no mês de Março de 2017, na estação do outono. Em cada uma das coletas foram amostrados dois pontos do rio, um a montante da barragem de acumulação e do ponto de captação de água da ETA de Porto Belo (P1), e outra a jusante (P2), onde foram coletadas amostras de sedimento e peixes. Os peixes foram primeiramente anestesiados com benzocaína 1%, e o sangue coletado por punção cardíaca para análise de alterações nucleares e ensaio cometa. Em seguida os animais foram eutanasiados por secção medular, pesados, medidos e o fígado, cérebro, músculo, rim posterior e brânquias foram coletados. Os biomarcadores de biotransformação e estresse oxidativo foram analisados em amostras de fígado, e de neurotoxicidade em amostras de cérebro e músculo. Amostras de sangue, fígado, rim posterior e cérebro foram destinadas a análises dos biomarcadores genéticos e a histopatologia foi realizada em amostras de fígado, rim posterior e brânquias. A presença do herbicida glifosato foi detectada no sedimento ($11,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$) do ponto a montante do local de captação de água (P1), na primavera. A menor atividade da enzima de biotransformação superóxido dismutase (SOD), bem como o aumento de danos no DNA renal e no tecido hepático coincidiram com a menor atividade da acetilcolinesterase (AChE) muscular e cerebral, no ponto P1, em relação ao ponto P2 na estação da primavera, de menor índice de chuvas ($81,8\text{mm}^3$). Também foi observada uma variação sazonal entre as estações da primavera e outono, nas respostas dos peixes aos biomarcadores. A redução das atividades da AChE muscular e das enzimas de biotransformação etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) e glutathione S-transferase (GST), e das enzimas antioxidantes como a SOD e glutathione peroxidase (GPx), bem como o aumento de danos no DNA cerebral, coincidiram com o maior número de lesões teciduais no fígado e brânquias na primavera, em relação ao outono, independente do ponto em análise. Conclui-se que o Rio Perequê apresenta contaminação por xenobióticos e provavelmente agrotóxicos provenientes da agricultura de arroz irrigado, indicando danos à biota e um potencial risco de saúde pública.

Palavras-chave: Biomonitoramento; Biomarcadores; Rio Perequê; *Geophagus brasiliensis*.

ABSTRACT

Aquatic ecosystems, especially the freshwater ecosystems, can provide unique and indispensable services for various human activities, as domestic, industrial, agricultural or commercial origin. Agriculture in particular has contributed significantly to the contamination of ecosystems due to the intensive use of pesticides. Among the main environmental impacts resulting from rice cultivation are the reduction of water quantity and quality due to eutrophication processes and the use of pesticides. This suited aimed to analyze the water quality of the Perequê River, Porto Belo, Santa Catarina, Brazil, through the chemical quantification of herbicides used in rice cultivation and the biomarkers analysis in the native fish species *Geophagus brasiliensis*. Two sampling were carried out in the Perequê River. The first on (C1) was in November 2016, in the spring season and the second n (C2), in March 2017, in the fall season. In each sampling, two points of the river were analyzed, one upstream of the accumulation dam and the water catchment point of the Porto Belo ETA (P1), and another downstream (P2) with water, sediment and fish sampling. Fish were anesthetized with 1% benzocaine, and blood was taken by cardiac puncture for morphological nuclear alterations and comet assay. Then the animals were euthanized by medullary section, weighed, measured and the liver, brain, muscle, posterior kidney and gills were collected. Biotransformation and oxidative stress biomarkers were analyzed in liver samples, and neurotoxicity in brain and muscle samples. Samples of blood, liver, posterior kidney and brain were intended for analysis of genetic biomarkers and histopathology was performed on samples from the liver, posterior kidney and gills. The presence of glyphosate herbicide was detected in the sediment ($11,7 \mu\text{g.kg}^{-1}$) from the point upstream of the water catchment site (P1) in the spring. The lower activity of the biotransformation enzyme superoxide dismutase (SOD), as well as increased damage to renal DNA and hepatic tissue, coincided with the lower activity of muscular and cerebral acetylcholinesterase (AChE) at point P1, in relation to point P2 in spring season, with a lower rainfall index ($81,8\text{mm}^3$). A seasonal variation was also observed between the spring and fall seasons, in fish responses to biomarkers. Reduction of muscle AChE activities and biotransformation enzymes etoxiresorufin-O-deethylase (EROD) and glutathione S-transferase (GST), and antioxidant enzymes such as SOD and glutathione peroxidase (GPx), as well as increased brain DNA damage, coincided with the highest number of tissue lesions in the liver and gills in spring, relative to autumn, regardless of the point under analysis. It is concluded that the Perequê River presents contamination by xenobiotics and probably pesticides from irrigated rice farming, indicating damages to the biota and a potential public health risk.

Keywords: Biomonitoring; Biomarkers; Perequê River; *Geophagus brasiliensis*.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|-------------|--|----|
| FIGURA 1 - | Localização da Microbacia do Rio Perequê, Santa Catarina..... | 19 |
| FIGURA 2 - | Localização e extensão do Rio Perequê..... | 20 |
| FIGURA 3 - | Localização da área de cultivo de arroz irrigado e ETA de Porto Belo..... | 21 |
| FIGURA 4 - | Pesca artesanal no Rio Perequê..... | 21 |
| FIGURA 5 - | Vegetação de manguezal remanescente na região estuarina... | 22 |
| FIGURA 6 - | Ocupação antrópica de ambas as margens da foz do Rio Perequê..... | 22 |
| FIGURA 7 - | Principais problemas ambientais presentes ao longo do curso do Rio Perequê..... | 23 |
| FIGURA 8 - | Poluição do Rio Perequê e da enseada de Porto Belo..... | 24 |
| FIGURA 9 - | Dinâmica dos agrotóxicos utilizados nas plantações de arroz no ambiente..... | 26 |
| FIGURA 10 - | Etapas gerais da biotransformação de agrotóxicos nos peixes..... | 30 |
| FIGURA 11 - | Tipos de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de peixes..... | 33 |
| FIGURA 12 - | Imagem do ensaio cometa..... | 34 |
| FIGURA 13 - | Espécie de peixe <i>Geophagus brasiliensis</i> do Rio Perequê..... | 36 |
| FIGURA 14 - | Estações de coleta..... | 38 |
| FIGURA 15 - | Pontos de coleta..... | 39 |
| FIGURA 16 - | Fator de Condição (K) e Índice hepatossomático (IHS) em <i>Geophagus brasiliensis</i> | 52 |
| FIGURA 17 - | Atividade da acetilcolinesterase nos tecidos cerebral e muscular em <i>Geophagus brasiliensis</i> | 53 |
| FIGURA 18 - | Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), Glutathione S-transferase (GST), Glutathione peroxidase (GPx) e concentração da Glutathione reduzida (GSH) em <i>Geophagus brasiliensis</i> | 54 |

| | | |
|-------------|---|----|
| FIGURA 19 - | Atividade da Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), e concentrações de Lipoperoxidação (LPO) e Metalotionínas (MET) em <i>Geophagus brasiliensis</i> | 55 |
| FIGURA 20 - | Scores de dano de DNA no tecido sanguíneo e cerebral em <i>Geophagus brasiliensis</i> | 56 |
| FIGURA 21 - | Scores de dano de DNA nos tecidos hepático e renal em <i>Geophagus brasiliensis</i> | 57 |
| FIGURA 22 - | Cortes histológicos de fígado de <i>Geophagus brasiliensis</i> , coletados no Rio Perequê, Porto Belo –SC..... | 59 |
| FIGURA 23 - | Cortes histológicos de rim de <i>Geophagus brasiliensis</i> , coletados no Rio Perequê, Porto Belo – SC..... | 61 |
| FIGURA 24 - | Cortes histológicos de brânquia de <i>Geophagus brasiliensis</i> , coletados no Rio Perequê, Porto Belo – SC..... | 63 |
| FIGURA 25 - | Escores da PCoA mostrando a posição das unidades amostrais em relação aos pontos (A) e estações (B)..... | 64 |
| FIGURA 26 - | Esquema geral dos resultados observados para cada biomarcador..... | 65 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|--|----|
| TABELA 1 - | ÓRGÃOS E RESPECTIVOS BIOMARCADORES AVALIADOS EM <i>Geophagus brasiliensis</i> NO RIO PEREQUÊ – SC..... | 48 |
| TABELA 2 - | DADOS PLUVIOMÉTRICOS DA ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO DE ITAPEMA, REFERENTES AOS MESES DE COLETA NOVEMBRO DE 2016 E MARÇO DE 2017..... | 50 |
| TABELA 3 - | CONCENTRAÇÃO DE GLIFOSATO E BENTAZONA NO SEDIMENTO DO RIO PEREQUÊ NOS PONTOS E ESTAÇÕES DE COLETA..... | 51 |
| TABELA 4 - | DADOS AMBIENTAIS MEDIDOS NO RIO PEREQUÊ NOS PONTOS E ESTAÇÕES DE COLETA..... | 51 |
| TABELA 5 - | FREQUÊNCIA DE MN E DE AMN EM ERITRÓCITOS MADUROS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> Mediana e Quartis (25%; 75%)..... | 57 |
| TABELA 6 - | FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE <i>Geophagus brasiliensis</i> COLETATADOS EM NOVEMBRO DE 2016 E MARÇO DE 2017, NO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC..... | 58 |
| TABELA 7 - | FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE LESÕES EM RIM DE <i>Geophagus brasiliensis</i> COLETATADOS EM NOVEMBRO DE 2016 E MARÇO DE 2017, NO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC..... | 60 |
| TABELA 8 - | FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE LESÕES EM BRÂNQUIAS DE <i>Geophagus brasiliensis</i> COLETATADOS EM NOVEMBRO DE 2016 (C1) E MARÇO DE 2017 (C2), NO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC..... | 62 |

LISTA DE SIGLAS

| | |
|---------------------------------|--|
| MAPA - | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MS - | Ministério da Saúde |
| MMA - | Ministério do Meio Ambiente |
| IBAMA - | Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis |
| PNRH - | Política Nacional de Recursos Hídricos |
| UGRHIs - | Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos |
| CONAMA - | Conselho Nacional do Meio Ambiente |
| FATMA - | Fundação do Meio Ambiente do Estado de Santa Catarina |
| ETA - | Estação de Tratamento de Água |
| CASAN - | Companhia Catarinense de Águas e Saneamento |
| AChE - | Acetilcolinesterase |
| ACh - | Acetilcolina |
| EROD - | Etoxiresorufina-O-deetilase |
| HPAs - | Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos |
| PCBs - | Bifenilas policloradas |
| DNA - | Ácido desoxidoribonucléico |
| GST - | Glutathione S-Transferase |
| PCDDs - | Dibenzodioxinas policloradas |
| GSH - | Glutathione reduzida |
| GPx - | Glutathione peroxidase |
| H ₂ O ₂ - | Peróxido de hidrogênio |
| ROS - | Espécies reativas de oxigênio |
| O ₂ - | Oxigênio molecular |
| O ₂ ^{•-} - | Radical superóxido |
| OH [•] - | Hidroxila |
| CAT - | Catalase |
| SOD - | Superóxido dismutase |
| H ₂ O - | Água |
| LPO - | Peroxidação lipídica |
| MET - | Metalotioneínas |

| | |
|-------------|--|
| LDL - | Lipoproteínas de baixa densidade |
| SisBio - | Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade |
| IC - | Cromatografia de íons com detecção por condutividade |
| HPLC - | Cromatografia líquida de alta eficiência |
| UV - | Ultravioleta |
| GC/MS - | Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas |
| HCl - | Ácido clorídrico |
| BSA - | Albumina de soro bovino |
| DTNB - | Ácido 5,5'-ditiobis-2- ácido nitrobenzóico |
| NADPH - | Fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida |
| HE - | Hematoxilina-eosina |
| CDNB - | 2,4-Dinitrochlorobenzeno |
| GR - | Glutathione redutase |
| GSSG - | Glutathione dissulfeto |
| TCA - | Ácido tricloroacético |
| NaCl - | Cloreto de sódio |
| ANOVA - | Análise variância de duas vias |
| PERMANOVA - | Análise de variância multivariada permutacional |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 | REVISÃO BIBLIOGRÁFICA..... | 18 |
| 2.1 | O RIO PEREQUÊ..... | 18 |
| 2.2 | A CULTURA DO ARROZ..... | 25 |
| 2.3 | AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA RIZICULTURA..... | 25 |
| 2.3.1 | Glifosato..... | 27 |
| 2.3.2 | Bentazona..... | 28 |
| 2.4 | BIOACUMULAÇÃO, BIOMAGNIFICAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO.. | 28 |
| 2.5 | BIOMARCADORES..... | 30 |
| 2.5.1 | Biomarcadores bioquímicos..... | 30 |
| 2.5.2 | Biomarcadores genéticos..... | 32 |
| 2.5.3 | Biomarcadores histopatológicos..... | 34 |
| 2.6 | BIOMONITORES..... | 35 |
| 2.7 | ESPÉCIE DE ESTUDO..... | 35 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 36 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 36 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 37 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 38 |
| 4.1 | PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS..... | 39 |
| 4.2 | DADOS PLUVIOMÉTRICOS..... | 40 |
| 4.3 | FATOR DE CONDIÇÃO E ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO..... | 41 |
| 4.4 | EXPERIMENTOS LABORATORIAIS..... | 41 |
| 4.4.1 | Análises químicas..... | 41 |
| 4.4.1.1 | Sedimento..... | 42 |
| 4.5 | BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS..... | 42 |
| 4.5.1 | Concentração proteica..... | 42 |
| 4.5.2 | Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)..... | 43 |
| 4.5.3 | Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)..... | 43 |
| 4.5.4 | Atividade da Glutathione S-transferase (GST)..... | 43 |
| 4.5.5 | Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)..... | 44 |
| 4.5.6 | Atividade da Catalase (CAT)..... | 44 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 4.5.7 | Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)..... | 44 |
| 4.5.8 | Concentração de Glutathione Reduzida (GSH)..... | 45 |
| 4.5.9 | Lipoperoxidação (LPO)..... | 45 |
| 4.5.10 | Concentração de Metalotioneínas (MET)..... | 45 |
| 4.6 | BIOMARCADORES GENÉTICOS..... | 46 |
| 4.6.1 | Ensaio Cometa..... | 46 |
| 4.6.2 | Alterações morfológicas nucleares..... | 47 |
| 4.7 | BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS..... | 47 |
| 4.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 49 |
| 5 | RESULTADOS..... | 50 |
| 5.1 | DADOS PLUVIOMÉTRICOS..... | 50 |
| 5.2 | ANÁLISE QUÍMICA DO SEDIMENTO..... | 50 |
| 5.3 | FATOR DE CONDIÇÃO (K) E ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS)..... | 52 |
| 5.4 | BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS..... | 53 |
| 5.4.1 | Neurotoxicidade..... | 53 |
| 5.4.1.1 | Atividade da Acetilcolinesterase..... | 53 |
| 5.4.2 | Biotransformação/estresse oxidativo..... | 54 |
| 5.5 | BIOMARCADORES GENÉTICOS..... | 56 |
| 5.6 | BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS..... | 58 |
| 5.7 | ANÁLISE MULTIVARIADA..... | 64 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 66 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 72 |
| | REFERÊNCIAS | 73 |

1 INTRODUÇÃO

Os ecossistemas aquáticos, em especial os de água doce podem prover serviços únicos e imprescindíveis para as diversas atividades humanas, garantindo a subsistência e o desenvolvimento da sociedade, garantindo o abastecimento público de água, a produção de hidroeletricidade, a exploração pesqueira, o transporte de cargas e passageiros, e a produção agrícola e industrial (TUNDISI & TUNDISI, 2011).

As diversas atividades poluidoras do ambiente sejam elas de origem doméstica, industrial, agrícola ou comercial, em especial nas últimas décadas, têm alterado de forma significativa a qualidade dos ecossistemas aquáticos, resultando na diminuição da disponibilidade de água potável para o consumo humano, além da perda de espécies e serviços ambientais (MALAJ *et al.*, 2014). A agricultura em especial tem contribuído de forma significativa para a contaminação dos ecossistemas, devido ao uso intensivo de agrotóxicos, cujos resíduos já foram identificados em alimentos, na atmosfera, nas precipitações secas e úmidas, no solo, e em águas superficiais e subterrâneas (DELLAMATRICE & MONTEIRO, 2014).

Os agrotóxicos, utilizados nas diversas culturas agrícolas podem atingir os corpos hídricos por diferentes rotas, dentre as quais o escoamento superficial encontra-se como a principal via de contaminação, principalmente nas estações chuvosas, que favorecem a descarga desses contaminantes (RASMUSSEN, *et al.*, 2015). Dentre outros fatores que podem afetar a contaminação dos corpos hídricos por esses compostos, estão: o tipo da cultura agrícola, sua distância em relação ao corpo hídrico, as propriedades físico-químicas do solo, as características do corpo hídrico (profundidade e taxa de fluxo), além de fatores climáticos como temperatura, precipitação, vento e umidade (LUO *et al.*, 2014).

De acordo com a Lei 7.802/1989 (BRASIL, 1989) e o Decreto 4074/2002 (BRASIL, 2002) compete ao Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) realizar a avaliação da eficácia agrônômica, ao Ministério da Saúde (MS) executar a avaliação e classificação toxicológica e ao Ministério do Meio Ambiente (MMA), por meio do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais

Renováveis (IBAMA), avaliar e classificar o potencial de periculosidade ambiental de todas as classes de agrotóxicos (ALMEIDA *et al.*, 2017).

Foi a partir da implementação da Política Nacional de Recursos Hídricos (PNRH), instituída pela Lei 9.433/97 (BRASIL, 1997), que a gestão dos recursos hídricos no Brasil adquiriu uma abrangência mais ampla, levando-se em conta sua interface com o saneamento ambiental e a saúde pública, uma vez que a contaminação dos recursos hídricos está frequentemente relacionada à saúde das diferentes populações expostas (SILVA *et al.*, 2017).

Outra importante contribuição da PNRH foi a de estabelecer um gerenciamento descentralizado, participativo e integrado dos recursos hídricos, na qual adotou-se a bacia hidrográfica como a unidade regional de planejamento e gerenciamento, resultando na criação das Unidades de Gerenciamento de Recursos Hídricos (UGRHs), tendo estes como órgãos consultivos e deliberativos os Comitês de Bacias Hidrográficas, constituídos por membros da sociedade civil e de órgãos governamentais. (GONÇALVES *et al.*, 2017).

Para fins de gerenciamento e fiscalização dos recursos hídricos, o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) dividiu os sistemas hídricos em 13 classes de acordo com o tipo e utilização de suas águas, definindo os limites de concentrações de diferentes grupos de poluentes para cada uma dessas classes, com o objetivo de garantir a proteção ambiental. Atualmente a Resoluções CONAMA nº 357/05 (BRASIL, 2005), nº 396/08 (BRASIL, 2008) e a Portaria do Ministério da Saúde 518/04 (BRASIL, 2004) dispõem sobre os limites máximos permissíveis para águas superficiais, subterrâneas, e de abastecimento público, respectivamente (GRANZIERA & GRANZIERA, 2014).

Especificamente no Estado de Santa Catarina, A Fundação do Meio Ambiente (FATMA) estabeleceu através da Portaria nº 017/02 (FATMA, 2002) limites máximos de toxicidade aguda para efluentes de diferentes origens, com o objetivo de assegurar que esses efluentes não possam causar, ou possuir potencial causador de efeitos tóxicos capazes de provocar alterações no comportamento, e na fisiologia dos organismos aquáticos presentes no corpo receptor (MAGALHÃES & FILHO, 2008).

Dentre os métodos de avaliação biológica utilizados nos estudos que visam averiguar os impactos de contaminantes sobre os organismos aquáticos está o chamado biomonitoramento, que baseia-se nas respostas dos organismos em

relação ao meio em que vivem, possibilitando a avaliação e identificação dos efeitos estressores de diferentes contaminantes presentes no ambiente ao longo do tempo (LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L., 2010). Essa abordagem atrelada aos métodos físico-químicos de monitoramento pode aumentar a eficiência dos sistemas de detecção de impactos ambientais sobre os recursos hídricos (BUUS; OLIVEIRA; BAPTISTA, *et al.*, 2008).

Uma das vantagens do biomonitoramento está em sua capacidade de identificar os efeitos de poluentes decorrentes de exposições agudas e crônicas, uma vez que os organismos estão presentes no ambiente por todo o seu ciclo de vida (BUUS; NESSIMIAN; BAPTISTA, 2003). Dentre os principais organismos utilizados no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos estão os peixes, macroinvertebrados bentônicos e os diversos organismos que compõem a comunidade perifítica (SANTOS *et al.*, 2017).

Entre suas inúmeras potencialidades o biomonitoramento destaca-se não apenas como uma eficiente ferramenta para a vigilância de risco ambiental, mas também no âmbito da saúde pública, possibilitando elucidar as relações entre a contaminação ambiental e os processos saúde – doenças dentro das populações humanas, em virtude de sua característica interdisciplinar (GAVRILESCU *et al.*, 2015).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 RIO PEREQUÊ

Os rios litorâneos do estado de Santa Catarina caracterizam-se por serem menos extensos do que os do interior, com relativa regularidade na distribuição das chuvas, garantindo um farto abastecimento durante todo o ano, com pequenas variações nos volumes de água, conferindo uma baixa amplitude entre as vazões máximas e mínimas (PRATES *et al.*, 1986).

A microbacia do Rio Perequê (FIGURA 1) encontra-se entre as coordenadas 48°37'58" W 27°7'42" S, possui uma área de 66,92 Km², com um perímetro de 34,63 km, e altitude máxima de 640m (CUTARELLI *et al.*, 2009). O clima regional é subtropical (Cfa), segundo a classificação de Köppen, com temperatura média no mês mais frio inferior a 18°C (mesotérmico) e temperatura média no mês mais

quente acima de 22°C, com verões quentes, geadas pouco frequentes, sem estação seca definida (PANDOLFO *et al.*, 2002).

As suas águas são geridas pelo Comitê de Gerenciamento da Bacia Hidrográfica do Rio Tijucas, conforme consta no Decreto Estadual nº 2.918/2001, que compreende a área da Bacia Hidrográfica do Rio Tijucas, seus tributários, e mais as microbacias dos Rios Perequê, Santa Luzia, Inferninho e Itapema, numa área que abrange um total de 13 municípios (SIRHSC, 2017).

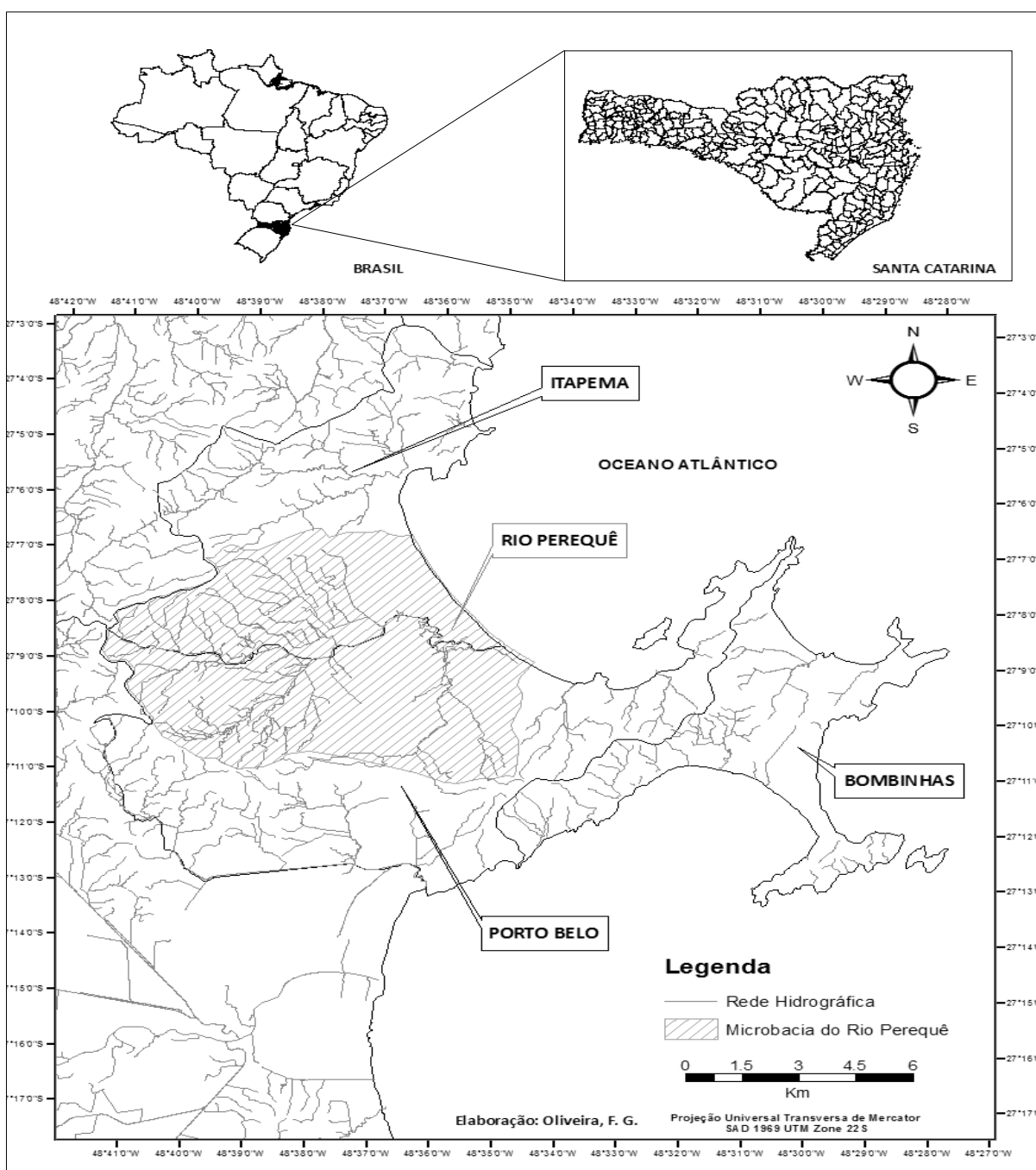


FIGURA 1 – Localização da Microbacia do Rio Perequê, Santa Catarina. FONTE: O autor (2018).

O Rio Perequê situa-se entre os municípios de Porto Belo e Itapema, em Santa Catarina, com aproximadamente 14 km de extensão, estando sua nascente localizada no Morro da Miséria, pertencente ao conjunto geomorfológico da Serra do Tijucas (FIGURA 2).



FIGURA 2 – Localização e extensão do Rio Perequê. FONTE: Modificado Google Earth (2016).

O curso do Rio Perequê percorre em sua maior extensão a parte rural de ambos os municípios, onde se encontra a Estação de Tratamento de Água (ETA), gerida pela Companhia Catarinense de Águas e Saneamento (CASAN), sendo responsável pelo abastecimento público de água dos municípios de Porto Belo e Bombinhas (SANTOS; MEURER; ATANAZIO, 2006). Adjacente à margem esquerda do Perequê localiza-se uma ampla área de cultivo de arroz irrigado, cujos efluentes são estravazados diretamente para o corpo hídrico, através dos canais de drenagem (FIGURA 3).



FIGURA 3 – Localização da área de cultivo de arroz irrigado e ETA de Porto Belo. FONTE: Modificado Everton Palaoro/Visor Notícias/SC Drones (2018).

Dentre outros usos, as águas do rio são destinadas à dessedentação de animais (pecuária), recreação e pesca artesanal praticada pela população local (FIGURA 4).



FIGURA 4 – Pesca artesanal no Rio Perequê. FONTE: O autor (2016).

O trecho de menor extensão do Perequê corresponde ao seu estuário, que percorre a área urbana dos dois municípios, apresentando um canal meandrante devido à baixa declividade da planície litorânea, com remanescentes de vegetação de manguezal (FIGURA 5), sendo as margens do trecho mais próximo da desembocadura do canal ocupadas por residências e marinas (FIGURA 6) (SIGNORIN *et al.*, 2010).



FIGURA 5 – Vegetação de manguezal remanescente na região estuarina. FONTE: O autor (2016).



FIGURA 6 – Ocupação antrópica de ambas as margens da foz do Rio Perequê. FONTE: Modificado Google Imagens. Autor: Ricardo Junior (2018).

Os principais problemas ambientais presentes ao longo do curso do Rio Perequê são o lançamento de agrotóxicos através dos canais de drenagem, efluentes domésticos não tratados (FIGURA 7a), o que leva a eutrofização e proliferação de macrófitas aquáticas (FIGURA 7b), ocorrência de processos erosivos marginais (FIGURA 7c), ocasionando pontos de assoreamento (FIGURA 7d), proliferação de espécies vegetais exóticas invasoras (FIGURA 7e) em decorrência do desmatamento da vegetação ciliar nativa (FIGURA 7f) (ÁGUAS DE ITAPEMA, 2013).



FIGURA 7 – Principais problemas ambientais presentes ao longo do curso do Rio Perequê: **7a.** Lançamento de efluentes domésticos não tratados; **7b.** Proliferação de macrófitas aquáticas; **7c.** Ocorrência de processo erosivo marginal; **7d.** Ponto de assoreamento; **7e.** Proliferação de espécies vegetais exóticas invasoras; **7f.** Desmatamento da vegetação ciliar nativa. FONTE: O autor (2016).

Outro problema recorrente nos últimos anos tem sido o vazamento de esgoto *in natura* da estação de tratamento de esgoto de Itapema (FIGURA 8), que tem resultado na contaminação não só do Rio Perequê, mas também da enseada de Porto Belo (PORTAL G1 SC, 2013; 2016; 2017).



FIGURA 8 – Poluição do Rio Perequê e da enseada de Porto Belo. FONTE: Modificado Daniel Gustavo (2017).

O Rio Perequê tem a FATMA como órgão ambiental responsável pelo seu monitoramento, sendo classificado como de classe 3₊ pela resolução CONAMA nº 357/2005, segundo ela as águas desta classe podem ser destinadas:

- a) ao abastecimento para consumo humano, após tratamento convencional ou avançado;
- b) à irrigação de culturas arbóreas, cerealíferas e forrageiras;
- c) à pesca amadora;
- d) à recreação de contato secundário; e
- e) à dessedentação de animais. (BRASIL, 2005, p.4).

Apesar de sua importância para a atividade pesqueira artesanal, e o abastecimento público de água dos municípios de Porto Belo e Bombinhas, não há na literatura nenhum estudo de biomonitoramento, que vise avaliar a saúde das espécies de peixes presentes no Rio Perequê, o que justifica a realização deste trabalho.

2.2 A CULTURA DO ARROZ

Dentre as monoculturas mais cultivadas a rizicultura destaca-se como a de maior potencial de aumento de produção, desempenhando papel estratégico na produção de alimentos, onde os países asiáticos são responsáveis por cerca de 90% da produção mundial, sendo os maiores países produtores, China, Índia, Indonésia, Vietnã, Tailândia, Brasil, Estados Unidos e Paquistão. O Brasil destaca-se atualmente com uma produção de cerca de 13 milhões de toneladas (safra 2014/2015) a maior do continente americano, sendo os estados do Rio Grande do Sul e Santa Catarina os maiores produtores, em Santa Catarina especificamente o arroz é produzido em 85 municípios, em sua maior parte pelo sistema irrigado, nos litorais Sul, Centro, Norte e nas regiões do baixo, médio e alto vale do Itajaí (SOSBAI, 2014).

A rizicultura apresenta três principais tipos de sistemas de plantio, a realizada em terras altas, várzeas úmidas e o irrigado por inundação, este último representa cerca de 60% da produção nacional. Dentre os principais impactos ambientais decorrentes da rizicultura estão: a redução de ecossistemas naturais para a abertura de novas áreas de plantio, redução da capacidade produtiva do solo, e a redução da quantidade e qualidade da água devido a processos de eutrofização e uso de agrotóxicos (EMBRAPA, 2004; SPADOTTO *et al.*, 2004).

2.3 AGROTÓXICOS UTILIZADOS NA RIZICULTURA

A agricultura moderna, oriunda da chamada revolução verde da década de 70 baseia-se estritamente na monocultura mecanizada, que visa à elevação da produtividade para a maximização dos lucros, empregando quantidades expressivas de agrotóxicos, principalmente fungicidas, inseticidas e herbicidas, causando a contaminação e o desequilíbrio dos ecossistemas, além de danos à saúde humana (ARAÚJO & OLIVEIRA, 2017; GRÜTZMACHER *et al.*, 2008).

No estado de Santa Catarina a aplicação de herbicidas na rizicultura no sistema de plantio irrigado por inundação, é realizada predominantemente pelo método de benzedura, que consiste em sua aplicação direta na lâmina d'água, tanto no período de pré-semeadura quanto de pós-emergência do arroz e das plantas

daninhas, maximizando o risco de contaminação de rios, açudes, lagos e represas (NOLDIN *et al.*, 1997; MATIAS & TAMANAHA, 2016).

Diferentemente de outras culturas, a dinâmica dos agrotóxicos nos sistemas de cultivo de arroz irrigado favorece a contaminação de águas superficiais e subterrâneas (FIGURA 9), uma vez que a água utilizada é extravasada diretamente para o corpo hídrico através dos canais de drenagem, carregando grandes quantidades desses contaminantes, trazendo prejuízos para todo o ecossistema aquático (MARTINI *et al.*, 2012).

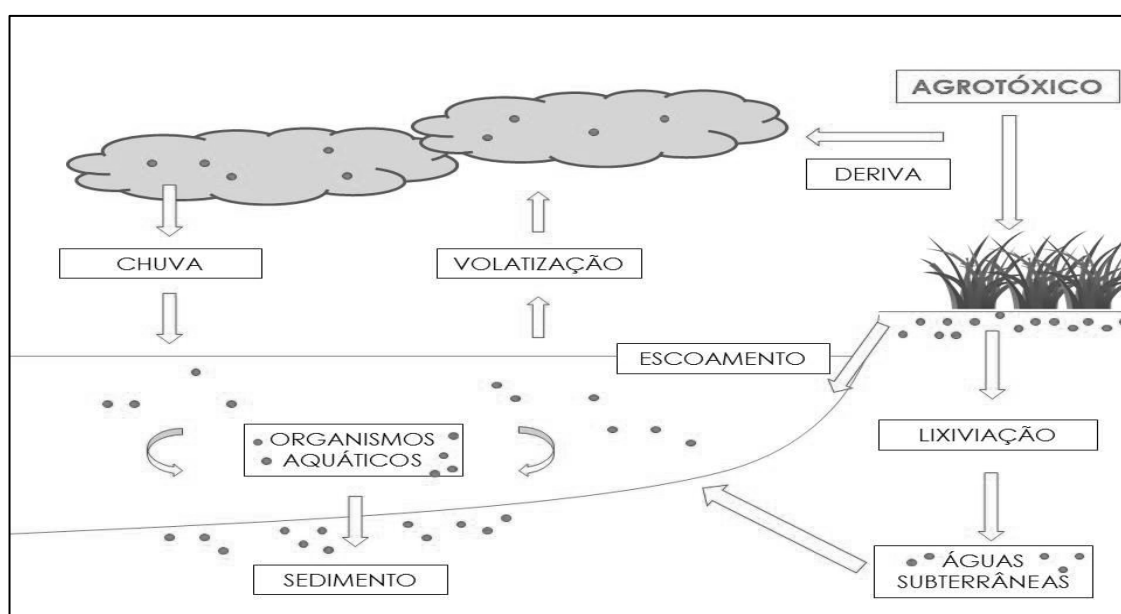


FIGURA 9 – Dinâmica dos agrotóxicos utilizados nas plantações de arroz no ambiente. Fonte: Modificado de NIMMO (1985).

Atualmente está registrado no MAPA um total de 76 herbicidas, de diferentes classes de toxicidade e potencial de periculosidade ambiental, todos recomendados para a cultura de arroz irrigado (AGROFIT, 2017). Dentre estes, os mais frequentemente utilizados nas áreas de cultivo de arroz irrigado na microbacia do Perequê, são os herbicidas glifosato e bentazona.

Agrotóxicos utilizados nas lavouras de arroz podem resultar na toxicidade de espécies não alvo, como os peixes (COPATTI *et al.*, 2009), causando neurotoxicidade (MODESTO & MARTINEZ 2010; ROSSI *et al.*, 2011), hepatotoxicidade (GÜNGÖRDÜ *et al.*, 2012), estresse oxidativo (LUSHCHAK *et al.*, 2009; MORAES *et al.*, 2007), lesões teciduais (WIJEYARATNE & PATHIRATNE,

2003), danos genéticos (NEUPARTH *et al.*, 2006), entre outros efeitos, prejudicando o desenvolvimento e a sobrevivência de diversas espécies.

Outro grave problema que surge da contaminação das águas superficiais e subterrâneas adjacentes a áreas de cultivo de arroz, está no fato de que estas águas geralmente são utilizadas para o consumo humano, podendo gerar sérios problemas de saúde pública, uma vez que os sistemas de tratamento convencional não possuem a capacidade de remover totalmente tais contaminantes (SILVA *et al.*, 2011).

2.3.1 Glifosato

O glifosato (N-(fosfonometil) glicina) é um herbicida não sistêmico, não seletivo, pós-emergência introduzido comercialmente pela empresa Monsanto em 1974, sendo atualmente o mais consumido em todo o mundo, e utilizado em diversas culturas (BENBROOK, 2016). A introdução dos cultivares geneticamente modificados (resistentes ao glifosato) na década de 1990 elevou o uso do herbicida, favorecendo a disseminação de espécies daninhas resistentes a ele (MYERS *et al.*, 2016). Apesar de sua alta eficiência contra diversas espécies daninhas, devido à resistência inerente de certas espécies de pragas, o glifosato é frequentemente utilizado em associação com outros herbicidas seletivos, geralmente aplicados nas épocas de pré-semeadura e pós-emergência (DUKE, 2015).

Nos diversos sistemas de cultivo o glifosato é aplicado através de pulverização, sendo absorvido pela planta através de suas folhas; uma vez na planta o glifosato atua na inibição da enzima 5-enolpiruvato-chiquimato-3-fosfato sintase (EPSPS), da via metabólica do ácido chiquímico, impedindo a síntese dos aminoácidos fenilalanina, tirosina e triptofano, essenciais ao crescimento da planta (GOMES *et al.*, 2014)

O glifosato presente na matéria orgânica morta ou adsorvido no solo é degradado por microorganismos, por meio de duas diferentes vias catabólicas, resultando em seu principal metabólito, o ácido aminometilfosfônico (AMPA), ou como metabólito intermediário (sarcosina), na rota alternativa (SINGH & SINGH, 2016), além de ser sensível à fotodegradação (GILL *et al.*, 2017). Nos corpos hídricos o glifosato dissipa-se rapidamente por conta de sua grande solubilidade em água, sendo degradado por microorganismos ou adsorvido ao sedimento,

principalmente em ambientes lênticos e pouco profundos (APARICIO *et al.*, 2013). Em ambientes marinhos, a persistência de glifosato e seu metabólito AMPA já foram observadas em águas com baixa ou nenhuma luminosidade (MERCURIO *et al.* 2014).

Efeitos danosos do herbicida glifosato sobre diferentes espécies de animais, plantas e em populações humanas já são amplamente encontrados na literatura (VAN BRUGGEN *et al.*, 2018). Tratando-se especificamente da exposição humana ao herbicida, no Estado de Santa Catarina, efeitos nocivos já foram observados em rizicultores expostos ao glifosato (SAVI *et al.*, 2010).

2.3.2 Bentazona

A bentazona (2,2-dióxido de 3-isopropil (1H)-benzo-2, 1,3-triadizin-4-ona) é um herbicida seletivo, tóxico, recomendado as culturas de soja, arroz, feijão, milho e trigo, aplicado no período de pós-emergência, e absorvido pelas partes verdes das plantas, interferindo na fotossíntese de espécies daninhas dicotiledôneas e monocotiledôneas da família *Cyperaceae* (HUBER & OTTO, 1994). A bentazona em contato com o solo é degradada por microorganismos, no entanto, devido a sua baixa capacidade de adsorção, é facilmente transportada tanto para águas superficiais, por meio do escoamento, quanto para águas subterrâneas via lixiviação do solo (BESSEGATO; SANTOS; LINDINO, 2012).

Por apresentar toxicidade elevada a bentazona apresenta risco a espécies não alvos, seja pela exposição aguda ou crônica, sendo frequentemente encontrada em águas superficiais próximas a culturas de arroz irrigado, representando um risco ambiental e de saúde pública (LÓPEZ-PIÑEIRO *et al.*, 2017).

2.4 BIOACUMULAÇÃO, BIOMAGNIFICAÇÃO E BIOTRANSFORMAÇÃO

Os ecossistemas aquáticos encontram-se frequentemente expostos a diversos tipos de contaminantes tóxicos, dentre os quais os agrotóxicos estão associados ao escoamento de áreas agrícolas, resultando na intoxicação de inúmeros organismos, principalmente peixes. Segundo Arnot & Gobas (2006), a bioacumulação trata-se do processo pelo qual a substância química é absorvida pelo organismo através de todas as rotas de exposição, ela ocorrerá quando a taxa de

absorção exceder a de eliminação. Nos peixes, as principais vias de absorção de xenobióticos são a branquial, dérmica, e oral, sendo posteriormente distribuídos a órgãos específicos (LANFRANCHI, 2006).

Dentre as propriedades físico-químicas dos xenobióticos que podem afetar seu comportamento no ambiente, assim como a sua bioacumulação em diferentes tipos de organismos, estão a polaridade, solubilidade e estabilidade da molécula em água, fotodegradação, volatilidade, e propriedades ácido-base (SANTANA & CALVACANTE, 2016). Além disso, outros fatores que influenciam a bioacumulação em organismos aquáticos são: (1) seu habitat, ou seja, o grau de exposição em um determinado local pode influenciar a quantidade do contaminante disponível para ser bioacumulado; (2) dieta, metabolismo, e comportamento, influenciam a bioacumulação para cada organismo; e (3) diferenças na composição e estrutura trófica podem afetar a magnitude da bioacumulação (GERIG, *et al.*, 2018). Uma vez bioacumulado o xenobiótico no organismo, este é transferido aos níveis tróficos superiores através da cadeia alimentar, atingindo concentrações maiores, a esse processo dá-se o nome de biomagnificação (D'AMATO *et al.*, 2002; GRAY, 2002).

Os xenobióticos absorvidos pelos organismos podem ser eliminados de duas maneiras, em sua forma original, ou biotransformado em um composto mais hidrofílico e facilmente excretável, através dos processos de biotransformação (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003). O órgão mais comumente envolvido na biotransformação de xenobióticos nos peixes é o fígado, devido ao seu papel na metabolização, embora significativa atividade também ocorra no rim, intestino e brânquias (SCHLENK, 2005). Em linhas gerais o processo de biotransformação pode alterar a toxicidade do xenobiótico, podendo resultar na eliminação do composto, ou transformando-o em um metabólito mais reativo e tóxico para o organismo (VERMEULEN, 1996).

As reações de biotransformação (FIGURA 10) ocorrem principalmente através das enzimas do sistema de monooxigenase dependente (citocromo P-450 ou CYP), além de diversas enzimas que catalisam as reações das fases envolvidas (KLEINOW *et al.*, 1987). Nos peixes, os xenobióticos absorvidos na fase 0, por meio de mecanismos celulares como, difusão passiva, difusão facilitada, infiltração por canais de membrana, transporte ativo e endocitose, podem estar presentes nas formas: (1) do composto original; (2) como metabólitos livres (primários), resultantes da fase I, responsável pela conversão de xenobióticos lipofílicos em compostos mais

hidrossolúveis, por meio de reações de hidrólise, oxidação, redução ou recombinação; ou (3) conjugados (secundários), resultantes da fase II, formados pela reação dos metabólitos primários com moléculas endógenas de ocorrência natural no peixe, como ácido glucurônico, glutathione, sulfato, aminoácidos, e outros compostos, sendo normalmente mais polares, tornando-se facilmente excretáveis para fora das células por várias famílias de proteínas de transporte na fase III. Outro destino possível para os xenobióticos absorvidos está em serem armazenados em depósitos com alto teor lipídico, sendo posteriormente remobilizados em situações de estresse, que demandam energia para manter a homeostase do organismo (SCHLENK *et al.*, 2008; SANTANA & CAVALCANTE, 2016).

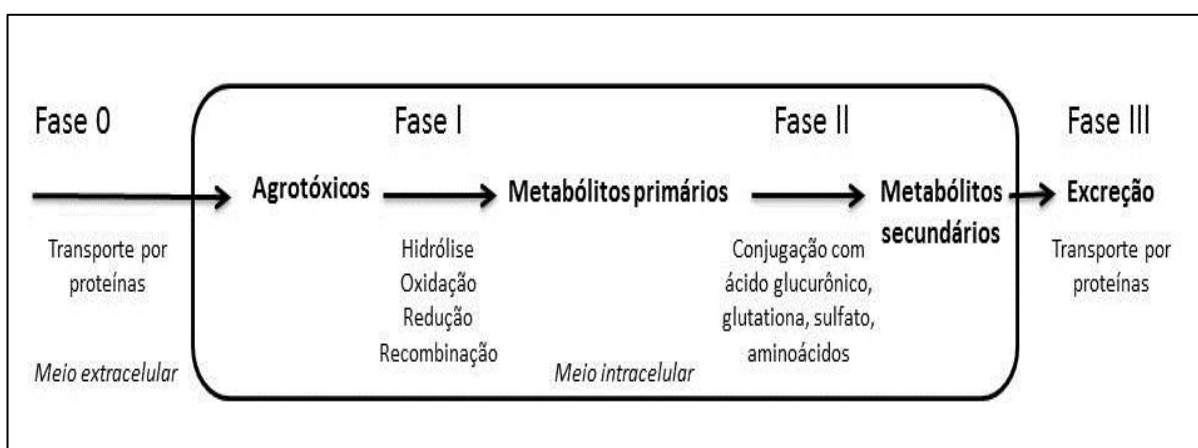


FIGURA 10 - Etapas gerais da biotransformação de agrotóxicos nos peixes. FONTE: Modificado de SANTANA & CAVALCANTE (2016).

2.5 BIOMARCADORES

Os biomarcadores podem ser definidos como alterações biológicas mensuráveis, que podem ser utilizadas como indicativos da exposição ou efeito de um xenobiótico, permitindo determinar o grau de impacto na saúde da biota e humana (FUENTES-RIOS *et al.*, 2005; LAW & GRAY, 2003; JESUS *et al.*, 2008).

2.5.1 Biomarcadores bioquímicos

A AChE é um biomarcador específico para inseticidas organofosforados e carbamatos, porém alguns trabalhos relatam a sua inibição por outros compostos, como metais pesados e hidrocarbonetos, e até mesmo indução por metais

bivalentes (GUILOSKI *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2014; OLIVEIRA RIBEIRO & SILVA DE ASSIS, 2005). A acetilcolinesterase (AChE), presente no sistema nervoso autônomo é a enzima responsável pela hidrólise do neurotransmissor acetilcolina (ACh), que regula a transmissão do impulso nervoso, sendo vital para o correto funcionamento dos sistemas sensorial e neuromuscular, tornando-o um excelente biomarcador de neurotoxicidade (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

O processo de biotransformação inclui numerosos sistemas de diferentes enzimas e substratos capazes de alterar a atividade biológica de compostos tóxicos e assim prevenir o dano celular. Dentre as enzimas utilizadas como biomarcadores, está a etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), pertencente à subfamília do citocromo P-450 (CYP1A), tendo papel fundamental na fase I do processo de biotransformação de compostos orgânicos, tendo a capacidade de transformar xenobióticos lipofílicos em compostos mais hidrofílicos facilitando a excreção dessas substâncias, sendo induzida por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs), bifenilas policloradas (PCBs), policlorinados dibenzofuranos (PCDF), e inibida por compostos organoestânicos (COEs). Entretanto, muitos metabólitos formados durante o processo de biotransformação, são altamente reativos podendo causar danos ao ácido desoxidoribonucléico (DNA), levando a carcinogênese (BENEDETTI *et al.*, 2007; SIMONATO *et al.*, 2011; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A glutathione-S-transferase (GST) enzima de conjugação da fase II do processo de biotransformação - também utilizada como biomarcador - atua em compostos lipofílicos resultantes da fase I, como HPAs, PCBs, dibenzodioxinas policloradas (PCDDs), e outros compostos eletrofílicos altamente reativos. Os compostos conjugados geralmente mais polares do que os metabólitos de fase I, tornam-se mais hidrofílicos e facilmente excretáveis (GEORGE, 1994; LU; WANG; ZHU, 2009; JARA & WIEGAND, 2008; SCHLENK *et al.*, 2008).

Como todos os organismos aeróbicos, os peixes são susceptíveis ao ataque de espécies reativas de oxigênio (ROS), resultantes da redução do oxigênio molecular (O_2), em peróxido de hidrogênio (H_2O_2), radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$) e hidroxila (OH^{\cdot}), durante o processo de biotransformação, causando estresse oxidativo e dano celular (MARTÍNEZ-ÁLVAREZ *et al.*, 2005; VAN DER OOST, BEYER, VERMEULEN, 2003).

Enzimas especializadas do sistema antioxidante como a catalase (CAT), superóxido dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) e o cofator não

enzimático glutathiona reduzida (GSH), têm sido amplamente utilizadas como biomarcadores em peixes (BIRNIE-GAUVIN *et al.*, 2017; GHISI *et al.*, 2017; NARRA *et al.*, 2017).

A GSH participa das reações de biotransformação de fase II via GST na conjugação de intermediários eletrofílicos, e também atua como cofator da atividade da GPx na degradação da molécula de H_2O_2 – resultante do metabolismo celular – em água (H_2O), evitando danos oxidativos (MONTEIRO *et al.*, 2006; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

A SOD é uma metaloenzima que atua capturando radicais $O_2^{\cdot-}$, formando o H_2O_2 e O_2 através da reação de dismutação. O H_2O_2 é então degradado pela ação da CAT em água (H_2O) e O_2 ; diferentemente da CAT a GPx tem a capacidade de degradar – tendo a GSH como seu cofator – outros tipos de peróxidos, como os peróxidos lipídicos, evitando a peroxidação lipídica e os danos de membranas (VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

Dentre outros parâmetros biológicos utilizados como biomarcadores em estudos toxicológicos estão a peroxidação lipídica (LPO) e as metalotioneínas (MET). A LPO resultante do estresse oxidativo, induz alterações da integridade, fluidez e permeabilidade, acarretando em perda da funcionalidade das membranas, ao modificar lipoproteínas de baixa densidade (LDL), resultando em produtos potencialmente tóxicos, com efeitos mutagênicos e carcinogênicos já documentados (NIKI *et al.*, 2005; NIKI, 2009). As metalotioneínas (MET) são proteínas quelantes de metais, promotoras da regulação metabólica e estocagem de metais pesados potencialmente tóxicos, além de regularem a homeostasia de metais essenciais (ARIAS & SANTOS, 2008; VAN DER OOST; BEYER; VERMEULEN, 2003).

2.5.2 Biomarcadores genéticos

O estudo do dano no DNA causado por diferentes compostos químicos tem se demonstrado essencial nos estudos de genotoxicidade, sendo amplamente utilizado na avaliação do impacto de contaminantes sobre diferentes espécies de peixes (BRAHAM *et al.*, 2017; HOSHINA *et al.*, 2008; LEMOS *et al.*, 2008). Dentre os diferentes testes utilizados como biomarcadores de genotoxicidade em peixes, o teste de micronúcleo píficeo e alterações morfológicas nucleares e o ensaio cometa

destacam-se por sua sensibilidade em detectar danos genéticos em eritrócitos, (ANSARI *et al.*, 2011; SCHAUMBURG *et al.*, 2012).

O teste de micronúcleo proposto por Heddle (1973) avalia o dano de DNA através da análise do corpúsculo de Howell-Jolly, formado pela condensação de fragmentos ou mesmo cromossomos inteiros que se individualizaram do núcleo, logo após a anáfase, durante a divisão celular (Al-SABTI & METCALFE, 1995). Uma das principais adaptações ao teste do micronúcleo foi proposto por Carrasco *et al.* (1990), que consiste na avaliação de alterações morfológicas em núcleos de eritrócitos, sendo classificadas como: *micronuclei* (MN), *blebbed* (BL), *binucleate* (BN), *lobed* (LB), *vacuolated* (VD) e *notched* (NT) (FIGURA 11).

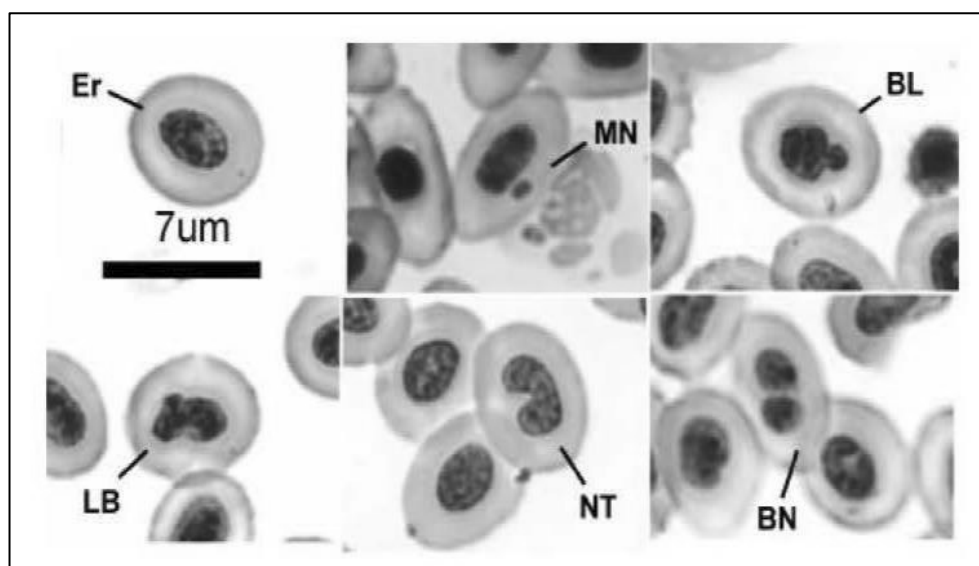


FIGURA 11 – Tipos de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos de peixes. FONTE: Modificado de Jiraungkoorskul & Sahaphong (2007).

O ensaio cometa é um método de mensuração das quebras das fitas de DNA em eritrócitos (FIGURA 12), que consiste em uma eletroforese em tampão alcalino de lâminas contendo células inseridas em agarose. Após a corrida o fragmento de DNA tende a migrar para o polo positivo da cuba de eletroforese, enquanto o DNA intacto permanece agregado, isso confere um aspecto de “cometa” ao material analisado (COLLINS, 2004; AZQUETA & COLLINS, 2013).

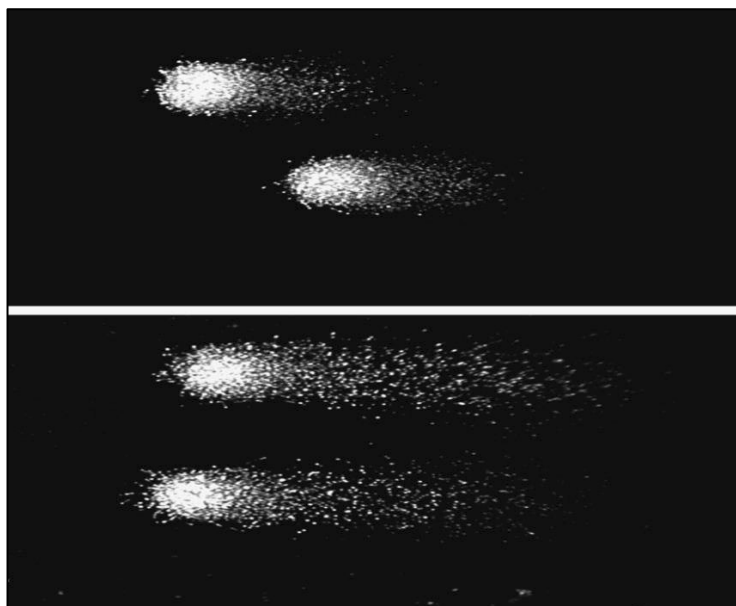


FIGURA 12 – Imagem do ensaio cometa. FONTE: Modificado de Singh (2016).

O ensaio cometa destaca-se como um método sensível, seguro e de ampla aplicabilidade, desde bioensaios de genotoxicidade, no biomonitoramento de ecossistemas, e em estudos epidemiológicos (COLLINS *et al.*, 2014; GUILHERME *et al.*, 2015; KOUSAR & JAVED, 2015; MARINOWIC *et al.*, 2012).

2.5.3 Biomarcadores histopatológicos

Efeitos histopatológicos podem ser considerados eficientes biomarcadores para a detecção de intoxicações agudas e crônicas em peixes, uma vez que expressam as condições de saúde dos organismos expostos a diferentes tipos de contaminantes (LIEBEL *et al.*, 2013). A exposição de peixes a contaminantes químicos frequentemente presentes nos ecossistemas aquáticos, podem induzir lesões a órgãos específicos, como o fígado, responsável pelos mecanismos de biotransformação e eliminação de compostos tóxicos, e as brânquias, responsáveis pelas trocas gasosas, e regulação osmótica (WINKALER *et al.*, 2001). Biomarcadores histopatológicos são frequentemente utilizados em conjunto com outras classes de biomarcadores, em bioensaios ecotoxicológicos e no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos expostos a contaminação por agrotóxicos (AGBOHESSI *et al.*, 2015; JAFFER *et al.*, 2017; TABASSUM *et al.*, 2016).

2.6 BIOMONITORES

Biomonitores são organismos que acumulam em seus tecidos e órgãos substâncias as quais estão expostos, permitindo sua quantificação e desta forma avaliar suas condições de saúde e de seu ambiente (CHAFFAI, 2014). Segundo Li (2010) o biomonitoramento consiste no uso sistemático de biomonitores para avaliar o impacto de fatores externos nos ecossistemas, em uma escala espaço-temporal definidas, possibilitando determinar diferenças entre um local e outro.

Os peixes destacam-se entre organismos mais utilizados no biomonitoramento dos ecossistemas aquáticos por apresentarem certas características que favorecem o estudo, como: longevidade, distribuição cosmopolita, serem consumidores primários e secundários, de fácil identificação e biologia bem conhecida (CHOVANEK; HOFER; SCHIEMER, 2003). Além disso, muitas espécies de peixes têm sido usadas extensivamente no monitoramento dos ambientes aquáticos, por manifestarem os efeitos dos contaminantes em diferentes níveis de organização biológica (DÍAZ & LÓPEZ, 2013).

2.7 ESPÉCIE DO ESTUDO

A espécie de peixe *Geophagus brasiliensis* (QUOY & GAIMARD, 1824), popularmente conhecida como cará, acará ou papa-terra (FIGURA 13), apresenta uma ampla distribuição geográfica, ocorrendo preferencialmente em ambientes lênticos, como lagoas de planícies de inundação, lagoas costeiras, riachos e rios, ocupando predominantemente regiões de remanso (ABELHA & GOULAR, 2004). Segundo Meschiatti (1995), a espécie apresenta atividade diurna, o que favorece sua captura, e hábito alimentar detritívoro-iliófago ou onívoro, aumentando sua exposição a contaminantes via cadeia trófica; essas características fazem da espécie um excelente biomonitor.

Devido a suas características ecológicas, dentre elas a flexibilidade reprodutiva, capacidade de se adaptar a ambientes lênticos e lóticos, e tolerância a variações ambientais, como a salinidade, a espécie *G. brasiliensis* tornou-se uma espécie invasora oportunista, promovendo o desequilíbrio de sistemas ecológicos em países como EUA, Taiwan, Filipinas e Austrália (BEATTY *et al.*, 2013).

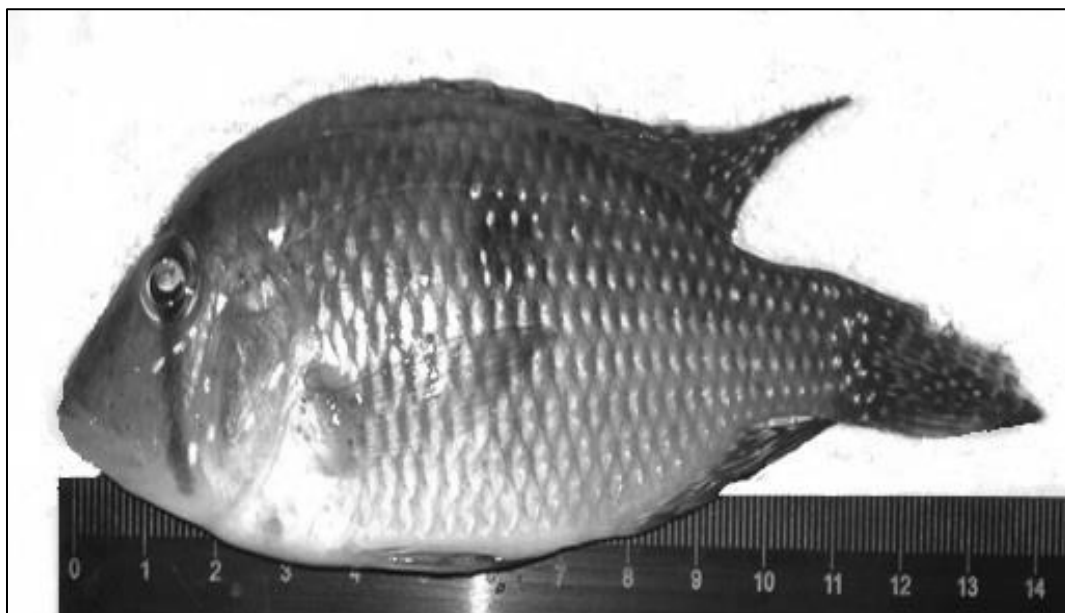


FIGURA 13 - Espécie de peixe *Geophagus brasiliensis* do Rio Perequê. FONTE: O autor (2017).

Por conta de suas características ecológicas a espécie tem sido utilizada no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos impactados por diferentes fontes de contaminação, como cianotoxinas (CALADO *et al.*, 2017), agrotóxicos utilizados na cultura do arroz (BENINCÁ, *et al.*, 2012), e efluentes agrícolas e urbanos (OSÓRIO *et al.*, 2014), justificando sua escolha para a realização deste estudo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a qualidade da água do Rio Perequê, Porto Belo, Santa Catarina – Brasil, por meio da quantificação química de herbicidas utilizados na rizicultura e da análise de biomarcadores na espécie de peixe nativa *Geophagus brasiliensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a saúde do peixe *G. brasiliensis* do Rio Perequê por meio do índice hepatossomático e do fator de condição;
- Avaliar o potencial neurotóxico da água do Rio Perequê no tecido cerebral e muscular do peixe *G. brasiliensis*, por meio da atividade da enzima acetilcolinesterase;
- Avaliar o sistema de biotransformação do peixe *G. brasiliensis* do Rio Perequê, por meio da atividade das enzimas EROD e GST;
- Avaliar o sistema antioxidante do fígado do peixe *G. brasiliensis* do Rio Perequê, por meio da atividade das enzimas SOD, CAT, GPx, e das concentrações de GSH e LPO;
- Avaliar a concentração de metalotioneínas no fígado do peixe *G. brasiliensis* do Rio Perequê;
- Avaliar o potencial genotóxico da água do Rio Perequê sobre a saúde do peixe *G. brasiliensis*, por meio da análise de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos, e do ensaio cometa nos tecidos sanguíneo, cerebral, hepático e renal;
- Avaliar os aspectos histopatológicos estabelecendo o índice de lesão somático nos tecidos hepático, renal e branquial de *G. brasiliensis* do Rio Perequê;
- Produzir informações que ajudem no monitoramento e gestão do recurso hídrico, na conservação das espécies aquáticas e promoção da saúde pública desta região.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PROCEDIMENTO DE COLETA DE DADOS

Duas coletas foram realizadas no Rio Perequê, a primeira coleta (C1) no mês de Novembro de 2016, na estação da primavera (FIGURA 14a), correspondendo ao período de desenvolvimento do arroz, posterior ao período de pulverização de agrotóxicos que se estende pela estação do inverno; e a segunda coleta (C2), no mês de Março de 2017, na estação do outono, correspondendo ao período de pós-colheita do arroz (FIGURA 14b).



FIGURA 14 – Estações de coleta: **14a** Primavera (C1) e **14b** Outono (C2). FONTE: O autor (2017).

Em cada uma das coletas foram amostrados dois pontos do Rio Perequê (FIGURA 15a), um a montante da barragem de acumulação (FIGURA 15b) e do ponto de captação de água da ETA de Porto Belo (P1), onde se desemboca os canais de drenagem da área de plantação de arroz irrigado, também caracterizado pela ausência de vegetação ciliar nativa (FIGURA 15c), e outro a jusante (P2), local com mata ciliar nativa presente, sob influência direta do estuário e de contaminação oriunda de efluentes domésticos (FIGURA 15d).



FIGURA 15 – Pontos de coleta: **15a.** Pontos de coleta P1 e P2; **15b.** Barragem de acumulação; **15c.** Ponto de coleta a montante da barragem (P1); **15d.** Ponto de coleta a jusante da barragem (P2). FONTE: O autor (2017).

Em ambos foram coletados peixes da espécie *Geophagus brasiliensis*, com o emprego de redes de nylon malha 4 cm. Ao todo foram coletados 39 espécimes de peixe, 24 na primeira coleta (C1), (P1 = 09, P2 = 15); e 15 na segunda coleta (C2) (P1 = 06, P2 = 09), respectivamente. Todos foram anestesiados com benzocaína 1%, pesados e medidos para os cálculos dos índices de condição e hepatossomático, e o sangue colhido através de punção cardíaca para as análises genéticas de alterações morfológicas nucleares e ensaio cometa. Em seguida, realizou-se a eutanásia por secção medular, sendo coletados o fígado, cérebro, músculo, rim posterior e brânquias. As amostras de fígado destinadas à realização das análises bioquímicas foram armazenadas em nitrogênio líquido, e posteriormente levadas ao Laboratório de Toxicologia Ambiental da UFPR. As amostras de sangue, cérebro, fígado e rim destinadas às análises genéticas foram

coletadas em frascos do tipo eppendorf contendo 1 mL de soro bovino fetal, armazenados em gelo e na ausência de luz, posteriormente levadas para o Laboratório de Mutagênese Ambiental da UFPR para análise. As amostras de fígado, rim e brânquias destinadas às análises histopatológicas foram fixadas em ALFAC (álcool 80%, formol 40% e ácido acético glacial), e conservadas em álcool 70%, posteriormente levadas para o Laboratório de Toxicologia Celular da UFPR para análise.

Os herbicidas glifosato e bentazona foram selecionados para quantificação química em sedimentos do Rio Perequê. A seleção foi feita baseada no levantamento realizado junto aos produtores da região, com o objetivo de se averiguar quais os herbicidas mais empregados durante a época de produção do arroz.

No mês de Novembro (C1), foram coletadas amostras de sedimento em cada um dos pontos (P1 e P2) para a quantificação química dos agrotóxicos glifosato e bentazona. No mês de Março (C2) foram coletas apenas amostras de sedimento para a quantificação química do agrotóxico glifosato em cada um dos pontos (P1 e P2) amostrados. Em todas as coletas foram avaliadas variáveis da água como, pH, temperatura e oxigênio dissolvido, com o uso de um medidor multiparâmetro portátil.

Para a coleta e transporte dos peixes foi concedida uma permissão para tais atividades pelo Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SisBio) pela solicitação número 54765-1. Também foi concedida autorização de acesso à área da ETA de Porto Belo pela Casan.

4.2 DADOS PLUVIOMÉTRICOS

Com o objetivo de se averiguar possíveis diferenças sazonais entre as estações, foram requisitados junto a Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (EPAGRI) os dados pluviométricos da estação de Itapema, referentes aos meses de coleta (Novembro de 2016 e Março de 2017).

4.3 FATOR DE CONDIÇÃO E ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO

Para se avaliar o grau de bem estar dos peixes frente ao estresse ambiental foram utilizados o fator de condição alométrico K (VAZZOLER, 1996) com a relação peso-comprimento estimada pela equação da relação peso-comprimento, como apresentadas nas equações abaixo:

$$K = P/C^b \quad (1)$$

$$P = aC^b \quad (2)$$

Em que:

P = peso total

C = comprimento total

a = intercepto da regressão

b = coeficiente angular

Os parâmetros “ a ” e “ b ” foram estimados após transformação logarítmica dos dados de peso e comprimento e subsequente ajuste de uma linha reta aos pontos pelo método dos mínimos quadrados.

O índice hepatossomático (IHS) foi calculado a partir da razão entre o peso do fígado do animal e seu peso total multiplicado por 100 (VAZZOLER, 1981; 1996), como apresentado na equação abaixo:

$$IHS = \frac{\text{peso do fígado do animal}}{\text{peso total do animal}} * 100 \quad (3)$$

4.4 EXPERIMENTOS LABORATORIAIS

4.4.1 Análises químicas

As amostras de sedimento foram armazenadas em frascos de vidro âmbar (1000 mL), armazenadas em caixa térmica com gelo (CETESB, 2011), posteriormente enviadas para as análises das concentrações dos agrotóxicos glifosato e bentazona, na empresa Global Análise & Consultoria.

4.4.1.1 Sedimento

Para a análise de concentração do agrotóxico glifosato nas amostras de sedimento foi realizada uma extração com solução alcalina, e em seguida utilizada cromatografia líquida de alta eficiência com detecção por ultravioleta (HPLC-UV) (FANG; WEI; LIU, 2014).

Para a análise de concentração do agrotóxico bentazona nas amostras de sedimento foi realizada uma extração líquido-líquido, e utilizado cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC/MS) (LI & LEE, 2000).

4.5 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

As amostras de cérebro e músculo foram homogeneizadas na proporção 1:10 em tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,5, com o auxílio do homogeneizador automático. Para as amostras de fígado foi utilizado o tampão fosfato de potássio 0,1M, pH 7,0 para a homogeneização. Para a análise das metalotioneínas as amostras de fígado foram homogeneizadas em tampão Tris HCl, pH 8,6. O homogeneizado foi centrifugado por 30 minutos a 4°C a 12.000 x g para as amostras de cérebro e músculo, e a 15.000 x g para as amostras de fígado. Do sobrenadante foi retirado alíquotas para a análise da EROD, GST, GSH, GPx, SOD, CAT, LPO, MET, AChE cerebral, AChE muscular, e dosagem de proteína. As alíquotas foram armazenadas em freezer -80°C para posterior análise.

4.5.1 Concentração proteica

Os dados nas diferentes análises bioquímicas foram normalizados pelas respectivas concentrações proteicas totais, quantificadas pelo método de Bradford (1976). Os homogenatos de todos os tecidos foram diluídos em uma proporção de 1:20. Após a diluição 10 µL da amostra diluída foi pipetada em microplaca e adicionado 250 µL da solução de Bradford. A concentração de proteínas foi determinada a partir da comparação dos valores de absorbância com aqueles provenientes de uma curva padrão realizada com albumina de soro bovino (BSA). A análise foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN) com comprimento de onda de 620 nm.

4.5.2 Atividade da Acetilcolinesterase (AChE)

O homogenato das amostras de cérebro e músculo foram diluídos para obter uma concentração de 1 mg/mL de proteína. Foram pipetadas na microplaca 50 µL da amostra diluída, 200 µL da solução de DTNB (0,75 mM) e 50 µL da solução de acetilcolina. A atividade da AChE foi medida segundo o método de Ellman *et al.* (1961), modificado para microplaca por Silva de Assis (1998). A absorbância foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN), em comprimento de onda de 415 nm.

4.5.3 Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD)

O método para determinar a atividade da EROD foi baseado em Burke & Mayer (1974), na qual baseia-se na detecção fluorimétrica da resorufina, depois de uma reação de oxigênio-desetilação. Foi pipetado na microplaca 50 µL da amostra de fígado e 200 µL de 7-etóxi. Após a incubação de 5 minutos foi adicionado 10 µL de fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH) e incubado por mais 5 minutos. A leitura foi realizada em fluorímetro, com excitação em 530 nm de comprimento de onda, e emissão em 590 nm, por 10 min a 27 °C.

4.5.4 Atividade da Glutathione S-transferase (GST)

O método para determinar a atividade da enzima GST foi baseado em Keen, Habig & Jakoy (1976). A GST catalisa a reação do substrato de 2,4-dinitrochlorobenzene (CDNB) com a GSH, formando um tioéter que pode ser monitorado pelo aumento da absorbância. O homogenato puro das amostras de fígado foi diluído para obter uma concentração de 2 mg/mL de proteína. Na microplaca UV foi adicionado 20 µL da amostra diluída e 180 µL de meio de reação, em triplicata. A análise foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN) em comprimento de onda de 340 nm.

4.5.5 Atividade da Superóxido Dismutase (SOD)

O método analisa a capacidade da SOD de inibir a redução do NBT para azul formazan, devido o oxigênio gerado pela hidroxilamina em solução alcalina. O homogenato puro das amostras de fígado foi diluído (1:10). Em 40 µL da amostra diluída foi adicionado 885 µL de tampão Tris-EDTA pH 8,0, 50 µL de pirogalol e incubadas por 30 minutos. Após a incubação foi adicionado 25 µL de HCl 1N e 300 µL da reação foi pipetada em microplaca. Para cada amostra foi feita uma amostra controle a qual não passou pelo processo de incubação. A análise foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN), em comprimento de onda de 560 nm (CROUCH; GANDY; KIMSEY, 1981).

4.5.6 Atividade da Catalase (CAT)

O método utilizado foi baseado em AEBI (1984), que consiste em medir a atividade da catalase através da degradação do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. O homogenato puro das amostras de fígado foi diluído (1:5) e 5 µL da amostra diluída foi pipetado na microplaca junto com 295 µL de solução reação. A análise foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN), em comprimento de onda de 240 nm.

4.5.7 Atividade da Glutathione Peroxidase (GPx)

O método para determinar a atividade da GPx baseou-se na medida do decréscimo de absorbância realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN) em comprimento de onda de 340 nm, gerado durante a redução da glutathione dissulfeto (GSSG), catalisada pela glutathione reduzida (GR), em presença do NADPH (HAFEMAN; SUNDE; HOEKSTRA, 1974). As amostras de fígado foram diluídas em uma proporção de 1:2. Uma alíquota de 10 µL da amostra diluída, 130 µL de solução de azida sódica e 60 µL de solução de peróxido de hidrogênio foram pipetadas em microplaca UV e a análise foi realizada após dois minutos.

4.5.8 Concentração de Glutathiona Reduzida (GSH)

O método para indicar a concentração da glutathiona reduzida foi baseado em Sedlak & Lindsay (1968). Uma alíquota de 200 µL de amostra de fígado pura com 50 µL de ácido tricloroacético (TCA) 50% foi utilizada e centrifugada à 10000x g por 10 minutos. Na microplaca foi pipetado 50 µL do sobrenadante, 230 µL de tampão TRIS 0,4 M e 20 µL de DTNB 2,5 mM. A análise foi realizada em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN), em comprimento de onda de 415 nm.

4.5.9 Lipoperoxidação (LPO)

A peroxidação de lipídios foi analisada através do método FOX, que baseia-se na rápida oxidação do Fe^{+2} mediada por peróxido sob condições ácidas e posterior formação do complexo Fe^{+3} – laranja de xilenol na presença do estabilizador hidroxitolueno butilado, que absorve a luz a 550-570 nm. O homogenato puro das amostras de fígado foi ressuspensionado em metanol (1:1) e centrifugado a 5000 x g por 5 minutos. Após, foi adicionado o reativo Fox à 100 µL do sobrenadante e incubadas por 30 minutos. Em microplaca foi pipetado 300 µL da reação, em triplicata. A análise em espectrofotometria de microplaca (Sunrise – TECAN) foi realizada em comprimento de onda de 560 nm (JIANG; HUNT; WOLFF, 1992).

4.5.10 Concentração de Metalotioneínas (MET)

A concentração de metalotioneínas foi analisada pelo método de Viarengo *et al.* (1997), que determina o conteúdo de sulfidrilas presentes nas metalotioneínas. Para esta análise foram feitas várias lavagens do material. Inicialmente, em 300 µL de amostra foram adicionados 342 µL de solução composta por etanol e clorofórmio. Este material foi centrifugado a 6000 x g por 10 minutos a 4 °C. 490 µL deste sobrenadante foram transferidos para novos microtubos, neles adicionada uma solução composta por etanol e HCl e foram mantidos em - 20°C por 60 minutos. Depois de novamente centrifugada, o sobrenadante foi descartado e o material ressuspensionado em solução com etanol, clorofórmio e tampão Tris-HCl (20 mM). O material foi novamente centrifugado, o sobrenadante descartado e o precipitado foi

ressuspendido em 50 μ L de cloreto de sódio (NaCl 250 mM) e 50 μ L de EDTA Sódico (EDTA a 4 mM e HCl a 1,0 M). A esse material foram adicionados 1000 μ L de solução de Ellman (DTNB; metanol; e tampão fosfato de sódio 0,2 M saturado de NaCl 2,0 M). Depois de centrifugado a 3000 x g por 5 minutos, 300 μ L do sobrenadante foi transferido para microplaca em triplicata e lido em espectrofotômetro de microplaca (Sunrise – TECAN), em comprimento de onda de 412 nm.

4.6 BIOMARCADORES GENÉTICOS

4.6.1 Ensaio cometa

Para a realização do ensaio cometa foi utilizada a técnica descrita por Speit & Hartmann (1999), com ajustes realizados por Cestari *et al.* (2004), Ferraro *et al.* (2004), para sangue e Ramsdorf *et al.* (2009) para fígado, rim e cérebro. As amostras de fígado, rim e cérebro foram homogeneizadas com o auxílio de homogeneizador automático a 200 x g por cerca de 30 segundos. Foram coletados 10 μ L da suspensão celular de sangue, e 20 μ L do homogenato obtido dos demais tecidos e misturados a 120 μ L de agarose LMP, previamente preparada e levemente aquecida a 37 °C; em seguida foram pipetadas alíquotas de cada um dos tecidos sobre lâminas previamente cobertas com agarose normal, e cobertas com lamínula e levadas a geladeira por 15 minutos. Após esse tempo as lâminas foram colocadas em solução de lise dentro de cubetas, mantidas em refrigerador por 24 horas. Na cuba de eletroforese, o tampão de eletroforese com pH maior de 13, foi adicionado por 25 minutos para o desenovelamento do DNA. Em seguida iniciou-se a corrida de eletroforese a 25 V e 300 mA por 25 minutos. As lâminas foram retiradas cuidadosamente e neutralizadas com 5mL de tampão de neutralização pH 7,5 por 5 minutos, repetida por mais duas vezes. As lâminas foram secas, fixadas com etanol por 5 minutos, e coloradas com brometo de etídio. A análise foi em teste cego de 100 nucleóides por lâmina, sob microscópio de epifluorescência com aumento de 400 x. Os nucleóides foram classificados segundo Collins *et al.* (1997) de acordo com o comprimento da cauda formada após a corrida eletroforética, sendo classificados em: 0 (sem dano aparente), 1 (dano pequeno), 2 (dano médio), 3 (dano extenso) e 4 (dano máximo). Foram atribuídos a cada classe os scores quantificados

de cada um dos tipos de danos. Os escores foram obtidos através da média ponderada do número de cometas encontrados em cada classe.

4.6.2 Alterações morfológicas nucleares

O teste do MN foi realizado de acordo com Heddle (1973) e Schmid (1975). Adicionou-se uma gota do sangue coletado numa lâmina e com o auxílio de uma laminula foi realizado o esfregaço, espalhando o sangue sobre a superfície da lâmina. As lâminas foram secas *overnight* e fixadas em etanol 96% por 30 minutos. A coloração foi realizada com Giemsa 10% diluída em tampão fosfato (pH 8,6) por 12 minutos. A análise foi baseada na contagem de 2000 células de cada animal em teste cego e considerando-se apenas os eritrócitos com membrana nuclear e citoplasmática intactas em microscópio óptico em aumento de 100x. As alterações na forma elíptica normal dos núcleos das hemácias que não se enquadraram no conceito de micronúcleo foram consideradas alterações morfológicas nucleares, segundo CARRASCO; TILBURY; MYERS; (1990): *Micronuclei (MN)*, *Blebbbed (BL)*; *Lobed (LB)*; *Vacuolated (VC)*; *Notched (NT)* e *Binucleus (BN)*.

4.6 BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

Para a análise histopatológica, as amostras de fígado, rim e brânquias foram fixadas em ALFAC por 16 horas. Depois, foram desidratados em série alcoólica, diafanizadas em xilol e incluídas em Paraplast®. Em micrótomo manual, com espessura de 7 µm, foram cortadas, posteriormente coradas com hematoxilina-eosina (HE) e finalmente montadas com resina Entellan®. Posteriormente, as lâminas foram analisadas segundo o índice de lesão calculado por Bernet *et al.* (1999) e descrito em Mela *et al.* (2007), onde alterações fotorreceptoras foram classificados em três fatores de severidade (mínima, moderada e acentuada importância patológica). O índice de lesão foi obtido após a aplicação da equação matemática estabelecida para cada grupo de lesão:

$$IL = \sum_{pr} \sum_{alt} (a \times w), \quad (4)$$

Em que:

pr = é o padrão de reação

alt = é a alteração

α = é o valor do score

w = é o fator de importância

Os resultados foram gravados em imagens digitalizadas por meio do fotomicroscópio Axiophot Zeiss.

Todos os órgãos e respectivos biomarcadores avaliados em *G. brasiliensis* no presente estudo estão descritos na Tabela 1.

TABELA 1 - ÓRGÃOS E RESPECTIVOS BIOMARCADORES AVALIADOS EM *G. brasiliensis* NO RIO PEREQUÊ – SC.

| ÓRGÃOS | BIOMARCADORES | | |
|-----------------|---|----------------------|------------------|
| | Bioquímicos | Genotoxicidade | Histopatológicos |
| Cérebro | AChE | Ensaio cometa | |
| Fígado | EROD, GST, GPx, GSH, SOD, CAT, LPO, MET | Ensaio cometa | Histopatologia |
| Rím | | Ensaio cometa | Histopatologia |
| Brânquia | | | Histopatologia |
| Músculo | AChE | | |
| Sangue | | Ensaio cometa AMN | |

AChE: Acetilcolinesterase, **EROD:** Etoxiresorufina-O-deetilase, **GST:** Glutathione-S-transferase, **GPx:** Glutathione peroxidase, **GSH:** Glutathione reduzida, **SOD:** Superóxido dismutase, **CAT:** Catalase, **LPO:** Lipoperóxidação, **MET:** Metalotioneínas. **AMN:** Alterações morfológicas nucleares.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados das análises químicas, fator de condição (K), índice hepatossomático (IHS) e biomarcadores foram expressos como média e erro padrão da média para os dados normais e mediana para os dados não normais. A normalidade dos dados foi testada pelo teste Shapiro-Wilk e a homogeneidade pelo teste de Bartlett. Para os dados que apresentaram distribuição normal e homocedasticidade, foi utilizada a análise variância de duas vias (ANOVA), seguido pelo teste de Fisher (LSD); quando os dados não apresentaram distribuição normal e/ou homocedasticidade, foi utilizada a análise de variância permutacional (PERMANOVA), seguida pela análise de comparação múltipla de médias *bootstrap*. Os dados foram analisados pelo programa R, pacotes ImPerm e ExpDes.pt. A regra de decisão foi de $p < 0,05$ para todas as análises. Para determinar se os biomarcadores diferiram entre pontos e estações foi utilizada uma análise de variância multivariada permutacional (PERMANOVA) aplicada sobre uma matriz de distância euclidiana com os dados dos biomarcadores previamente padronizados pelo desvio padrão (ANDERSON, 2001). Os pontos e estações foram testados como preditores em uma PERMANOVA bi-fatorial. Foi considerado o erro do tipo I como sendo menor do que 5%. Para visualizar diferenças, foi utilizado os escores de uma PCoA considerando os dois primeiros eixos (GOWER, 1966). As análises multivariadas PERMANOVA e PCoA foram realizadas pelo programa R, pacotes Vegan e Ape.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS PLUVIOMÉTRICOS

Os dados meteorológicos registrados pela estação de Itapema demonstram um índice pluviométrico menor no mês de Novembro de 2016 e maior no mês de Março de 2017 (TABELA 2), nos quais foram realizadas a primeira (C1) e segunda (C2) coletas, respectivamente.

TABELA 2 - DADOS PLUVIOMÉTRICOS DA ESTAÇÃO DE MONITORAMENTO DE ITAPEMA, REFERENTES AOS MESES DE COLETA NOVEMBRO DE 2016 E MARÇO DE 2017.

| | Estação: Itapema | | |
|-------------------------------|---|------------------------------------|----------------------|
| Mês/Estação/Ano/Coleta | Precipitação Total Mensal (mm³) | $\bar{x} \pm DP$ | Dias de Chuva |
| Novembro/Primavera/2016/C1 | 81,8 | 2,73 \pm 4,81 | 14 |
| Março/Outono/2017/C2 | 251,8 | 9,39 \pm 10,34 | 23 |

$\bar{x} \pm DP$: Média \pm desvio padrão. FONTE: EPAGRI (2017).

5.2 ANÁLISE QUÍMICA DO SEDIMENTO

Os resultados da quantificação dos agrotóxicos glifosato e bentazona nas amostras de sedimento, nos dois pontos do rio, coletadas nos meses de Novembro (C1) e Março (C2), estão descritos na TABELA 3. Os valores de bentazona nas amostras de sedimento, em ambos os pontos de coleta (P1 e P2), ficaram abaixo dos limites de quantificação (< LQ), na época da primavera (C1). Como não houve apreensão do herbicida bentazona no sedimento em ambos os pontos (P1 e P2), na primavera (C1), esta análise não foi repetida na estação do outono (C2). A presença do herbicida glifosato foi detectada no sedimento (11,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$) do ponto a montante do local de captação de água (P1), ficando abaixo do limite de quantificação no ponto a jusante (P2) na primavera (C1). As concentrações de glifosato no sedimento em ambos os pontos de coleta (P1 e P2), ficaram abaixo dos limites de quantificação (< LQ), no Outono (C2). Os dados ambientes medidos em ambas as coletas (C1 e C2) estão descritos na TABELA 4.

TABELA 3 - CONCENTRAÇÃO DE GLIFOSATO E BENTAZONA NA ÁGUA E SEDIMENTO DO RIO PEREQUÊ NOS PONTOS E ESTAÇÕES DE COLETA.

| Amostras | LQ | | Coletas | P1 | | P2 | |
|-----------|-----------------------------|------------------------------|---------|-------------------------------|------|------|------|
| | GTO | BNA | | GTO | BNA | GTO | BNA |
| Sedimento | 10 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ | 3,3 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ | C1 | 11,7 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ | < LQ | < LQ | < LQ |
| | | | C2 | < LQ | * | < LQ | * |

LQ: Limite de quantificação; GTO: Glifosato; BNA: Bentazona; P1: Ponto 1; P2: Ponto 2; C1: Primavera; C2: Outono. *Análises não realizadas.

TABELA 4 – DADOS AMBIENTAIS MEDIDOS NO RIO PEREQUÊ NOS PONTOS E ESTAÇÕES DE COLETA.

| Coletas | C1 | | C2 | |
|------------------|------|------|------|------|
| Pontos | P1 | P2 | P1 | P2 |
| pH | 5.87 | 5.52 | 6.89 | 6.63 |
| Temperatura (°C) | 23.3 | 20.1 | 24.7 | 24.9 |
| OD (mg/L) | 11,0 | 11,0 | 11,0 | 11,0 |

OD: Oxigênio dissolvido. P1: Ponto 1; P2: Ponto 2; C1: Primavera; C2: Outono.

5.3 FATOR DE CONDIÇÃO (K) E ÍNDICE HEPATOSSOMÁTICO (IHS)

A PERMANOVA demonstrou diferença para o fator de condição (K) entre os pontos P1 e P2, independente de qual estação em análise, sendo a média menor no ponto P2 ($1,52 \pm 0,21$) e maior no ponto P1 ($2,06 \pm 0,86$). Na análise do índice hepatossomático (IHS) houve diferença entre os pontos P1 e P2, dependente da estação, ($f=11,51$; $p<0,01$), com diferença entre P1 e P2 na estação primavera ($f=24,44$; $p<0,01$), menor valor médio no ponto P1 ($0,65 \pm 0,29$), e maior no ponto P2 ($1,58 \pm 0,71$). Também houve diferença entre as estações primavera e outono, dependente de qual ponto em análise ($f=19,63$; $p=0,054$), com diferença entre as estações no ponto P2 ($f=29,67$; $p<0,01$), com menor valor médio no outono ($0,70 \pm 0,12$) e maior na primavera ($1,58 \pm 0,71$) (FIGURA 16).

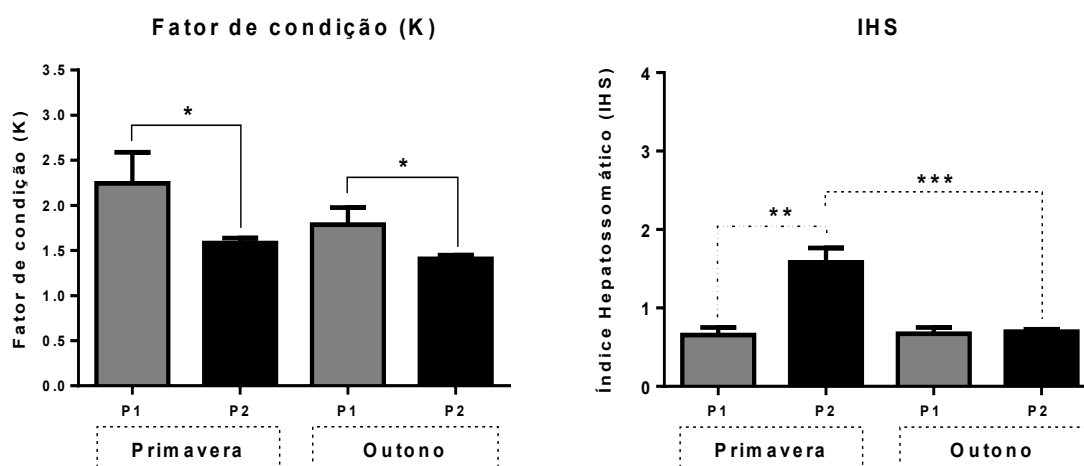


FIGURA 16 – Fator de Condição (K) e Índice hepatossomático (IHS) em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p<0,05$). * Diferença estatística entre os pontos de coleta P1 e P2, independente da estação; ** Diferença estatística entre os pontos P1 e P2 na estação da primavera. *** Diferença estatística no ponto P2 entre as estações primavera e outono.

5.4 BIOMARCADORES BIOQUÍMICOS

5.4.1 Neurotoxicidade

5.4.1.1 Atividade da Acetilcolinesterase

A ANOVA demonstrou diferenças na atividade da acetilcolinesterase (AChE) muscular ($f=5,33$; $p=0,02686$) e cerebral ($f=7,89$; $p=0,0084$), entre os pontos P1 e P2, independente de qual estação. A menor atividade média foi observada no ponto P1, no músculo ($30,18 \pm 14,28$) e cérebro ($30,15 \pm 6,04$), e a maior no ponto P2, no músculo ($39,53 \pm 15,16$) e cérebro ($36,07 \pm 7,01$). Também houve diferença na atividade da acetilcolinesterase muscular entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise, com menor atividade média na primavera ($29,28 \pm 11,93$), e maior no outono ($46,58 \pm 14,42$) (FIGURA 17).

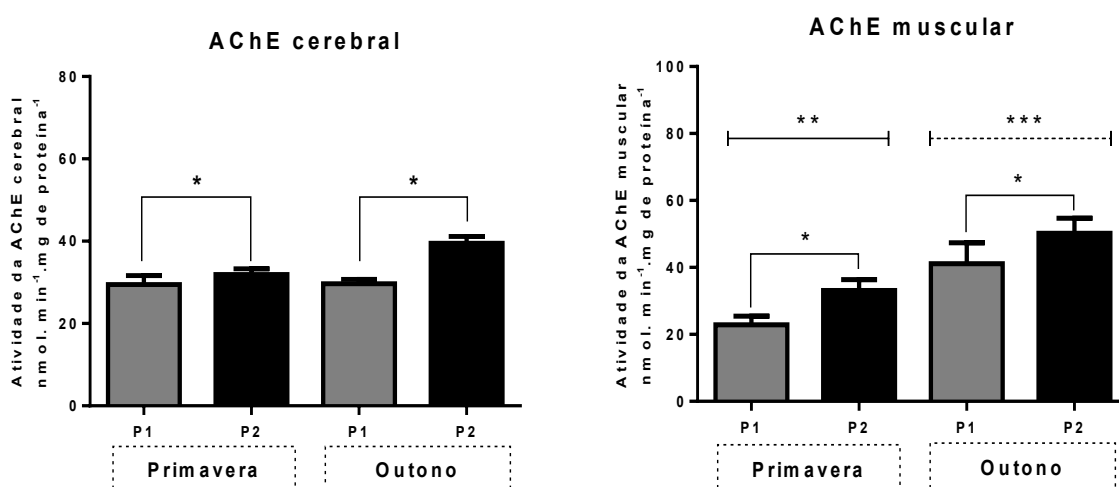


FIGURA 17 – Atividade da acetilcolinesterase nos tecidos cerebral e muscular em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p < 0,05$). * Diferença estatística entre os pontos P1 e P2, independente das estações. ** - *** Diferença estatística entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise.

5.4.2 Biotransformação/estresse oxidativo

A PERMANOVA demonstrou diferenças na atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD) ($f=33,60$; $p<0,001$) e glutathiona peroxidase (GPx) ($f=19,30$; $p<0,001$), entre as estações, independente de qual ponto em análise, com maior atividade média da EROD ($0,70\pm0,38$) e GPx ($166,48\pm64,35$) no outono, e menor ($0,20\pm0,11$) e ($96,03\pm29,13$), na primavera, respectivamente. A ANOVA demonstrou diferenças na atividade da glutathiona-S-transferase (GST) entre as estações, independente de qual ponto em análise ($f=17,67$; $p<0,001$), com menor atividade média na primavera ($197,17\pm42,79$) e maior no outono ($266,06\pm55,36$). Não houve diferenças nos níveis da glutathiona reduzida (GSH) (FIGURA 18).

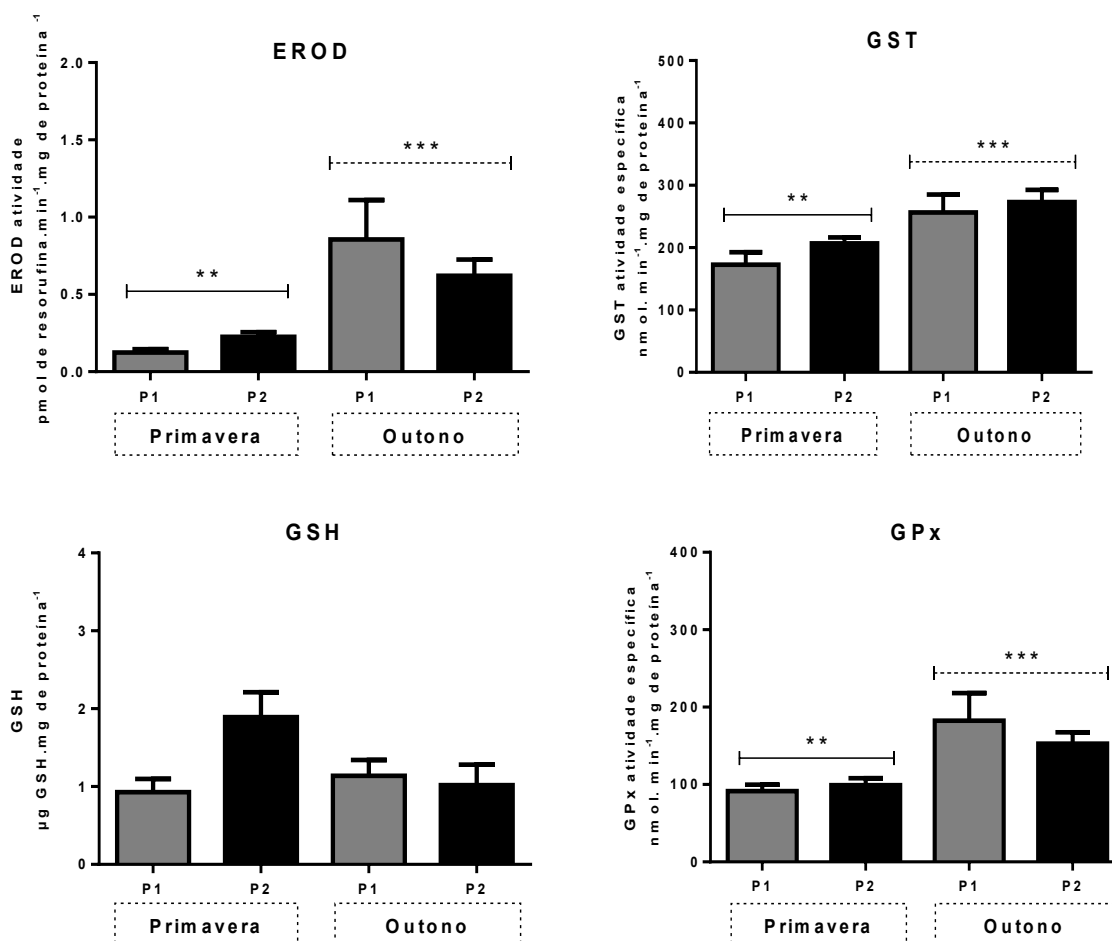


FIGURA 18 – Atividade da Etoxiresorufina-O-deetilase (EROD), Glutathiona S-transferase (GST), Glutathiona peroxidase (GPx) e Glutathiona reduzida (GSH) em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p<0,05$). ** - *** Diferença estatística entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise.

A PERMANOVA demonstrou diferenças na atividade da superóxido dismutase (SOD) entre as estações, independente de qual ponto em análise ($f=31,48$; $p<0,001$), com maior atividade média no outono ($368,57\pm118,12$) e menor na primavera ($203,82\pm95,44$). Também houve diferença entre os pontos, independente da estação em análise ($f=8,90$; $p=0,0054$), com maior atividade média no ponto P2 ($296,30\pm123,54$) e menor no ponto P1 ($206,14\pm125,06$). Também foi observada diferença na concentração de lipoperoxidação (LPO) na interação entre estações e pontos ($f=5,22$; $p=0,030$), com diferença entre as estações no ponto P2 ($f=8,51$; $p=0,006$), com menor concentração média na primavera ($3,13\pm0,82$) e maior no outono ($6,35\pm3,19$). Não houve diferenças na atividade da catalase (CAT) e concentração de metalotioneínas (MET) (FIGURA 19).

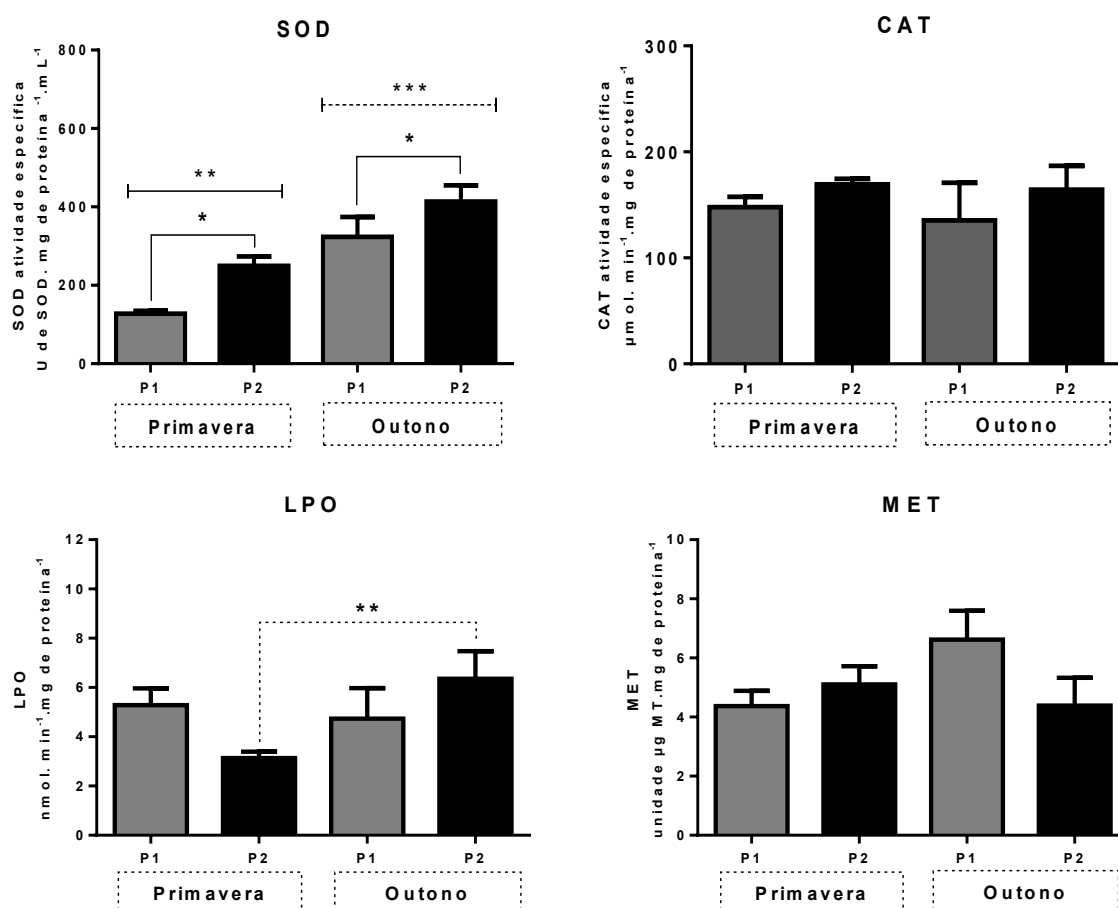


FIGURA 19 - Atividade da Superóxido dismutase (SOD), Catalase (CAT), e concentrações de Lipoperoxidação (LPO) e Metalotioneínas (MET) em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p<0,05$). * Diferença estatística entre os pontos de coleta P1 e P2, independente da estação. ** - *** Diferença estatística entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise. ** Diferença estatística no ponto P2 entre as estações primavera e outono.

5.5 BIOMARCADORES GENÉTICOS

A ANOVA demonstrou diferenças nos scores de dano genético no tecido cerebral entre as estações primavera e outono ($f=11,65$; $p=0,0017$), independente de qual ponto em análise, com menor média nos scores de danos no outono ($173,13 \pm 42,84$), e maior na primavera ($237,38 \pm 63,69$). Não houve diferenças entre os scores de dano genético no tecido sanguíneo (FIGURA 20).

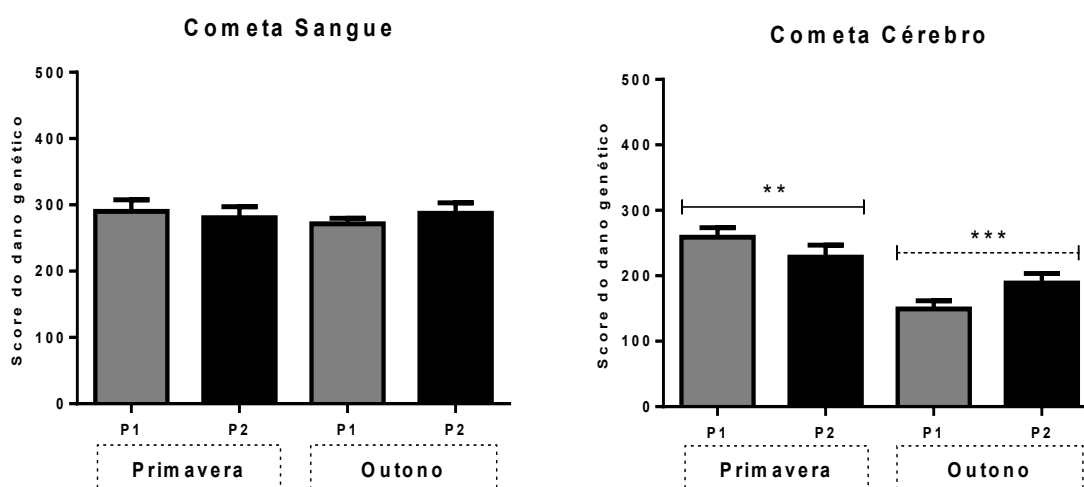


FIGURA 20 - Scores de dano de DNA no tecido sanguíneo e cerebral em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p < 0,05$). ** - *** Diferença estatística entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise.

A PERMANOVA demonstrou diferença na interação entre estações e pontos para a alteração do tipo “lobed”, com diferença entre os pontos P1 e P2 na estação do outono ($f=9,96$; $p=0,004$), com menor ocorrência média da alteração no ponto P2 ($0,25 \pm 0,46$) e maior no ponto P1 ($1,50 \pm 1,29$). Também houve diferenças entre as estações no ponto P1 ($f=10,80$, $p=0,003$), com menor ocorrência média na primavera ($0,22 \pm 0,44$), e maior no outono ($1,50 \pm 1,29$) (TABELA 5).

TABELA 5 - FREQUÊNCIA DE AMN EM ERITRÓCITOS MADUROS DE *Geophagus brasiliensis* Mediana e Quartis (25%; 75%).

| | MN | BD | LB | NT | VD | BN | AMN |
|-------------|-------------|----------------|-------------------------------|-------------------|--------------------|--------------------|--------------|
| C1P1 | 1 (1; 1) | 1 (1; 1) | 1 [†] (1; 1) | 5 (3; 10) | 2.5 (1,75; 6,5) | 3 (3; 3) | 3 (0; 7) |
| C1P2 | 1 (1; 2) | 1.5 (1; 2) | 1 (1; 1) | 5 (2; 9.5) | 4 (2; 6) | 1,5 (1,25;1,75) | 3 (0; 7) |
| C2P1 | 0 (0; 0) | 2 (2; 2,5) | 2* [†] (1.5; 2,5) | 5.5 (3,5; 7,5) | 8 (4,5; 10) | 0 (0; 0) | 0 (0; 2) |
| C2P2 | 1 (1; 1) | 1 (1; 1,25) | 1* (1; 1) | 3 (2; 5,25) | 3 (1; 3) | 1 (1; 1) | 2 (0;5,5) |

C1: Coleta Novembro 2016, **C2:** Coleta Março 2017, **P1:** Ponto a montante, **P2:** Ponto a jusante, **MN:** *Micronuclei*, **BD:** *Blebbled*, **LB:** *Lobed*, **NT:** *Notched*, **VD:** *Vacuolated*, **BN:** *Binucleus*, **AMN:** Alterações morfológicas nucleares. *Diferença estatística entre os pontos P1 e P2 no outono.

[†]Diferença estatística entre as estações no ponto P1.

A ANOVA demonstrou diferenças nos scores de danos genéticos no tecido renal na interação entre estações e pontos ($f=4,76$; $p=0,037$), com diferença entre os pontos P1 e P2 na primavera ($F=8,55$; $p<0,007$), com menor score de dano genético médio no ponto P2 ($222,0\pm123,0$), e maior no ponto P1 ($311,67\pm51,14$). Não houve diferença nos scores de dano genético no tecido hepático (FIGURA 21).

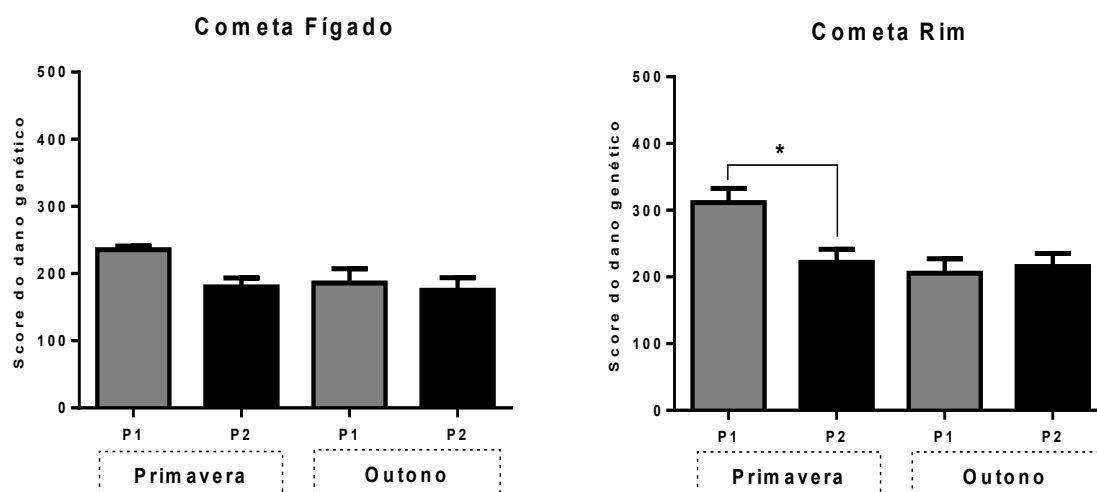


FIGURA 21 - Scores de dano de DNA nos tecidos hepático e renal em *Geophagus brasiliensis*. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p<0,05$). * Diferença estatística entre os pontos P1 e P2, na estação da primavera.

5.6 BIOMARCADORES HISTOPATOLÓGICOS

A ANOVA demonstrou diferenças no índice de lesão do tecido hepático entre os pontos P1 e P2, independente de qual estação ($f=16,50$; $p<0,001$), com maior índice de lesão tecidual médio no ponto P1 ($20,67\pm7,69$) e menor no ponto P2 ($11,71\pm7,09$). Também houve diferença entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise ($f=19,19$; $p<0,001$), com menor índice de lesão tecidual médio no outono ($10,57\pm6,00$), e maior na primavera ($22,0\pm6,82$). As lesões encontradas no fígado estão demonstradas na Tabela 6 e Figura 22. Em ambos os pontos amostrais (P1 e P2), e estações (primavera e outono), foram identificadas lesões como áreas de necrose (FIGURA 22B), dilatação dos sinusóides (FIGURA 22C), esteatose (FIGURA 22D), centros de melanomacrófagos (FIGURA 22E), e infiltração leucocitária (FIGURA 22F).

TABELA 6 – FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE LESÕES EM FÍGADO DE *Geophagus brasiliensis* COLETADOS EM NOVEMBRO DE 2016 E MARÇO DE 2017, NO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC.

| Coletas | Estações | Pontos | NA | IL | ES | DS | CMM | Índice de lesão | n |
|-----------|------------------|-----------|----|----|----|----|-----|-----------------|---|
| C1 | Primavera | P1 | 30 | 14 | 14 | 14 | 16 | 25 | 7 |
| | | P2 | 12 | 12 | 6 | 8 | 6 | 17 | 5 |
| C2 | Outono | P1 | 10 | 10 | 6 | 6 | 4 | 14 | 5 |
| | | P2 | 8 | 6 | 2 | 8 | 16 | 9 | 9 |

C1: Coleta Novembro 2016, **C2:** Coleta Março 2017, **P1:** Ponto a montante, **P2:** Ponto a jusante, **AN:** Área de necrose, **IL:** Infiltração leucocitária, **ES:** Esteatose, **DS:** Dilatação dos sinusóides, **CMM:** Centro de melanomacrófagos, **n:** Número de indivíduos analisados.

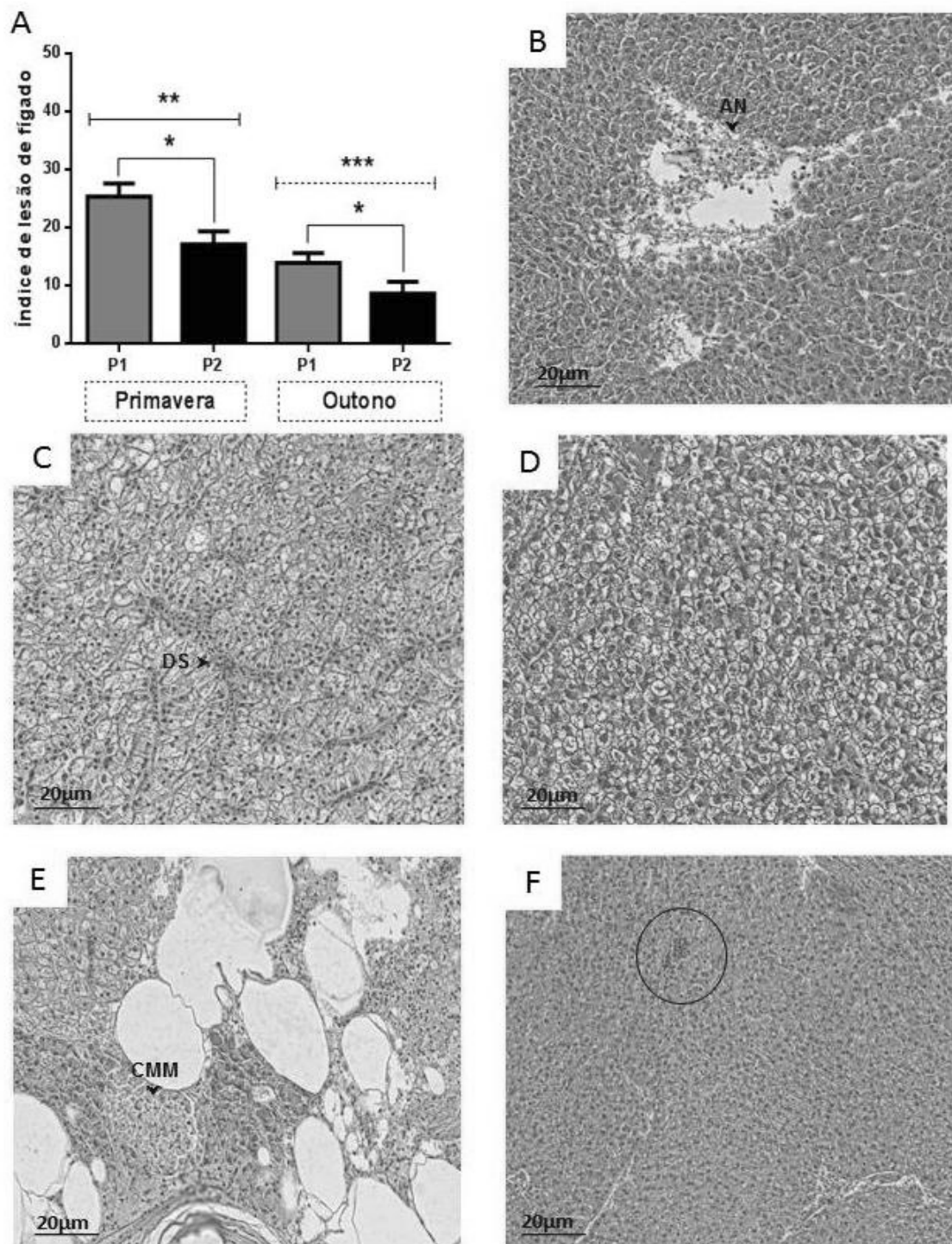


FIGURA 22 – Cortes histológicos de fígado de *Geophagus brasiliensis*, coletados no Rio Perequê, Porto Belo – SC. Coloração em Hematoxilina e Eosina. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p < 0,05$). **A:** gráfico dos índices de lesões histopatológicas no tecido hepático. * Diferença estatística entre os pontos P1 e P2, independente das estações. ** - *** Diferença estatística entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise. **B:** Área de necrose (AN). **C:** Dilatação dos sinusóides (DS). **D:** Esteatose. **E:** Centros de melanomacrófagos (CMM). **F:** Infiltração leucocitária.

As lesões encontradas no rim estão demonstradas na Tabela 7 e na Figura 23. Não houve diferenças no índice de lesão no tecido renal (Figura 23A). Em todos os pontos amostrais (P1 e P2), e estações (primavera e outono), foram identificadas lesões como alterações na arquitetura do glomérulo (Figura 23B), centro de melanomacrófagos (Figura 23C) e áreas de necrose (Figura 23D).

TABELA 7 – FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE LESÕES EM RIM DE *Geophagus brasiliensis* COLETADOS EM NOVEMBRO DE 2016 E MARÇO DE 2017, NO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC.

| Coletas | Estações | Pontos | NA | CMM | AG | Índice de lesão | n |
|-----------|------------------|-----------|----|-----|----|-----------------|---|
| C1 | Primavera | P1 | 10 | 4 | 6 | 15 | 3 |
| | | P2 | 8 | 10 | 10 | 11 | 5 |
| C2 | Outono | P1 | 8 | 6 | 8 | 11 | 4 |
| | | P2 | 8 | 4 | 8 | 8 | 5 |

C1: Coleta Novembro 2016, **C2:** Coleta Março 2017, **P1:** Ponto a montante, **P2:** Ponto a jusante, **AN:** Área de necrose, **CMM:** Centro de melanomacrófagos, **AG:** Alteração na arquitetura do glomérulo
n: Número de indivíduos analisados.

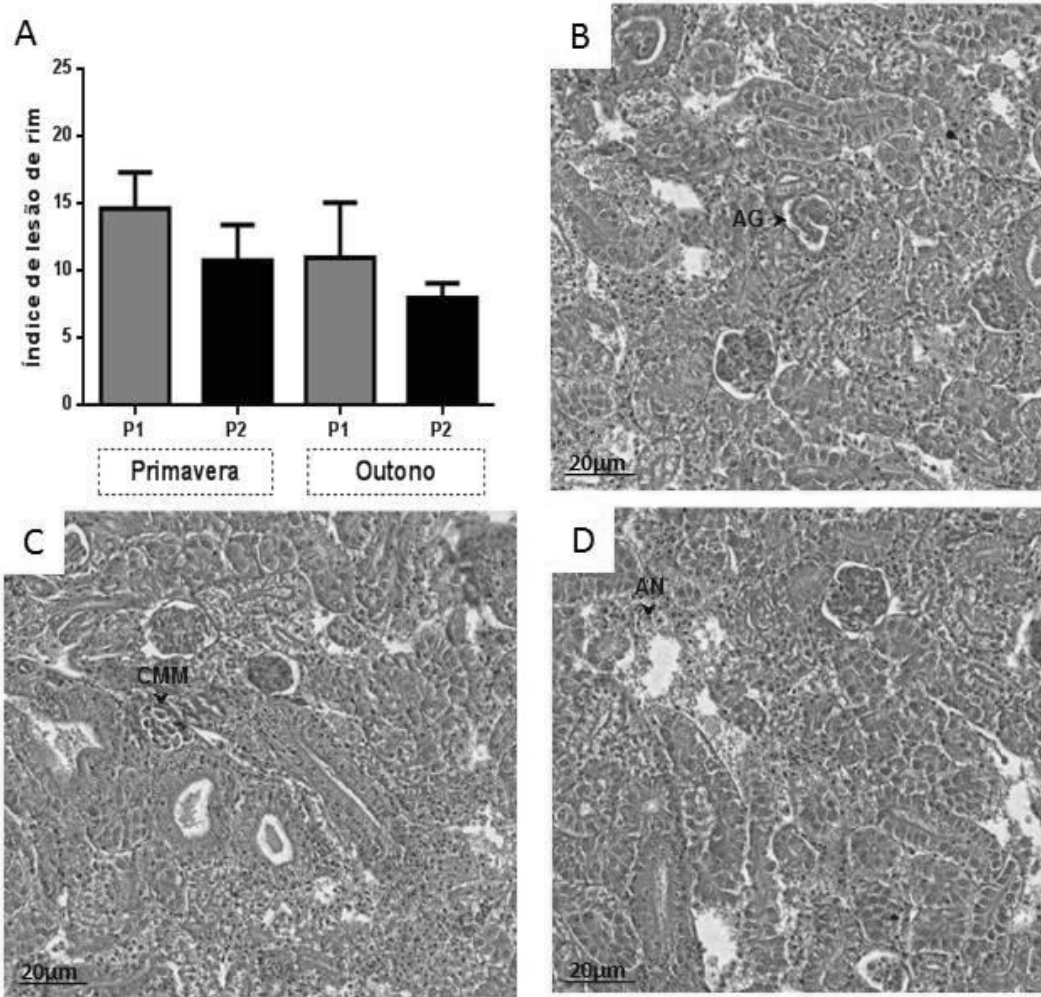


FIGURA 23 – Cortes histológicos de rim de *Geophagus brasiliensis*, coletados no Rio Perequê, Porto Belo – SC. Coloração em Hematoxilina e Eosina. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p < 0,05$). **A:** gráfico dos índices de lesões histopatológicas no tecido renal; **B:** Alteração na arquitetura do glomérulo (AG); **C:** Centro de melanomacrófagos (CMM); **D:** Área de necrose (AN).

As lesões encontradas nas brânquias estão demonstradas na Tabela 8 e na Figura 24. A análise de variâncias PERMANOVA demonstrou diferença entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise ($f=93,81$; $p<0,001$), com menor índice de lesão tecidual médio no outono ($5,67\pm1,15$), e maior na primavera ($12,31\pm1,97$). Em ambos os pontos amostrais (P1 e P2), e estações (primavera e outono), foram identificadas lesões como elevação do epitélio respiratório (Figura 24B) e hiperplasia celular (Figura 24C).

TABELA 8 – FREQUÊNCIA DE OCORRÊNCIA DE LESÕES EM BRÂNQUIAS DE *Geophagus brasiliensis* COLETADOS EM NOVEMBRO DE 2016 (C1) E MARÇO DE 2017 (C2), NO RIO PEREQUÊ, PORTO BELO – SC.

| Coletas | Estações | Pontos | EER | HC | Índice de lesão | n |
|-----------|------------------|-----------|-----|----|-----------------|---|
| C1 | Primavera | P1 | 28 | 24 | 13 | 6 |
| | | P2 | 32 | 26 | 12 | 7 |
| C2 | Outono | P1 | 10 | 10 | 6 | 5 |
| | | P2 | 14 | 12 | 5 | 7 |

C1: Coleta Novembro 2016, **C2:** Coleta Março 2017, **P1:** Ponto a montante, **P2:** Ponto a jusante, **EER:** Elevação do epitélio respiratório, **HC:** Hiperplasia celular, **n:** Número de indivíduos analisados.

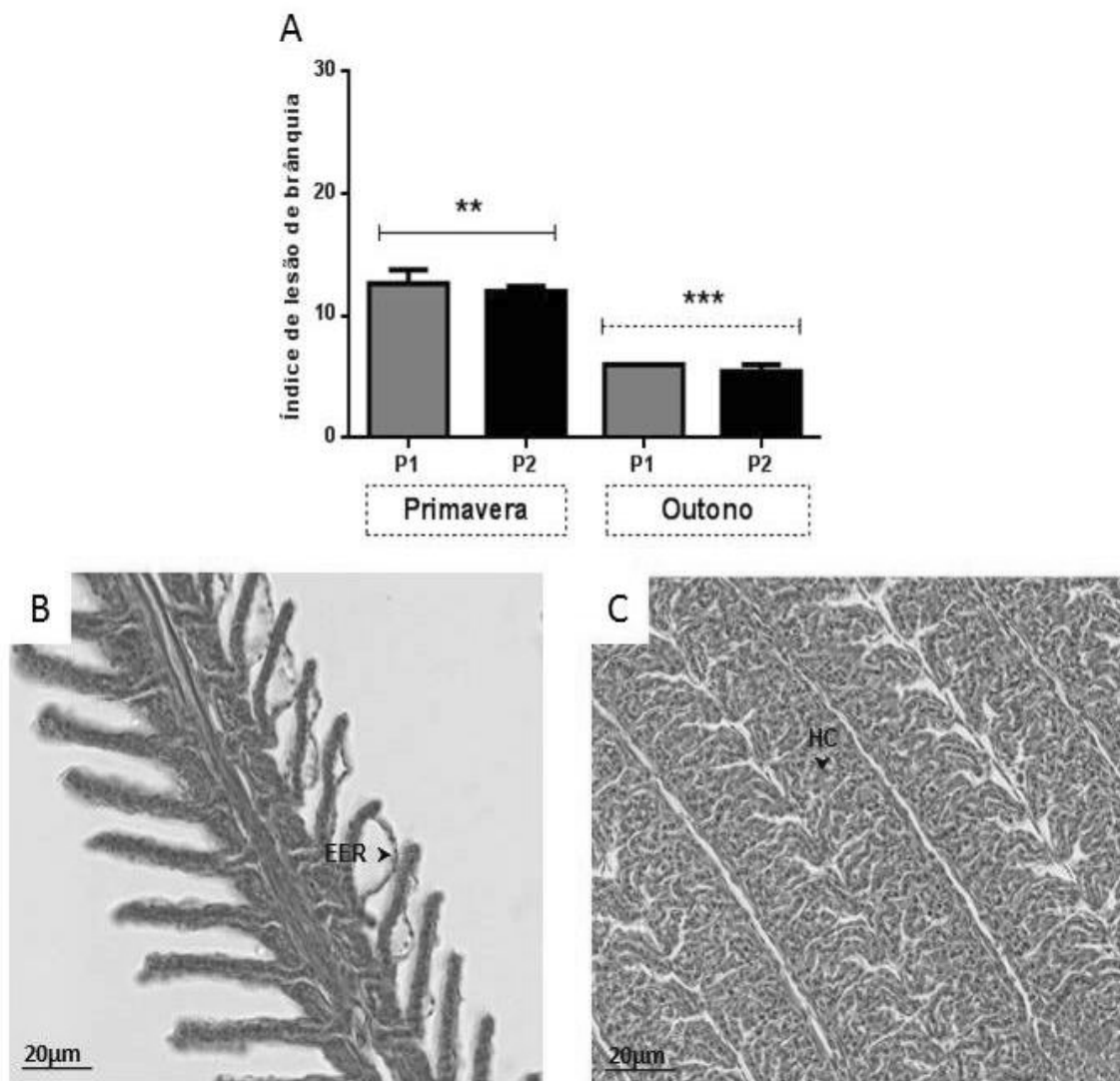


FIGURA 24 – Cortes histológicos de brânquia de *Geophagus brasiliensis*, coletados no Rio Perequê, Porto Belo – SC. Coloração em Hematoxilina e Eosina. Os resultados estão expressos em média \pm erro padrão para dados normais e mediana \pm erro padrão para dados não normais. Análise de variâncias ANOVA e PERMANOVA ($p < 0,05$). ** - *** Diferença estatística entre as estações primavera e outono, independente de qual ponto em análise. **A**: gráfico dos índices de lesões histopatológicas no tecido renal; **B**: Elevação do epitélio respiratório (EER); **C**: Hiperplasia celular (HC).

5.7 ANÁLISE MULTIVARIADA

A PERMANOVA apresentou diferenças entre os pontos P1 e P2 ($p=0,025$; $R^2=0,050$), e entre as estações primavera e outono ($p<0,001$; $R^2=0,20$). A PCoA apresentou porcentagem de explicação de 12% e 6%, para os eixos 1 e 2, respectivamente, demonstrando uma diferença espacial maior entre as estações, do que os pontos (FIGURA 25).

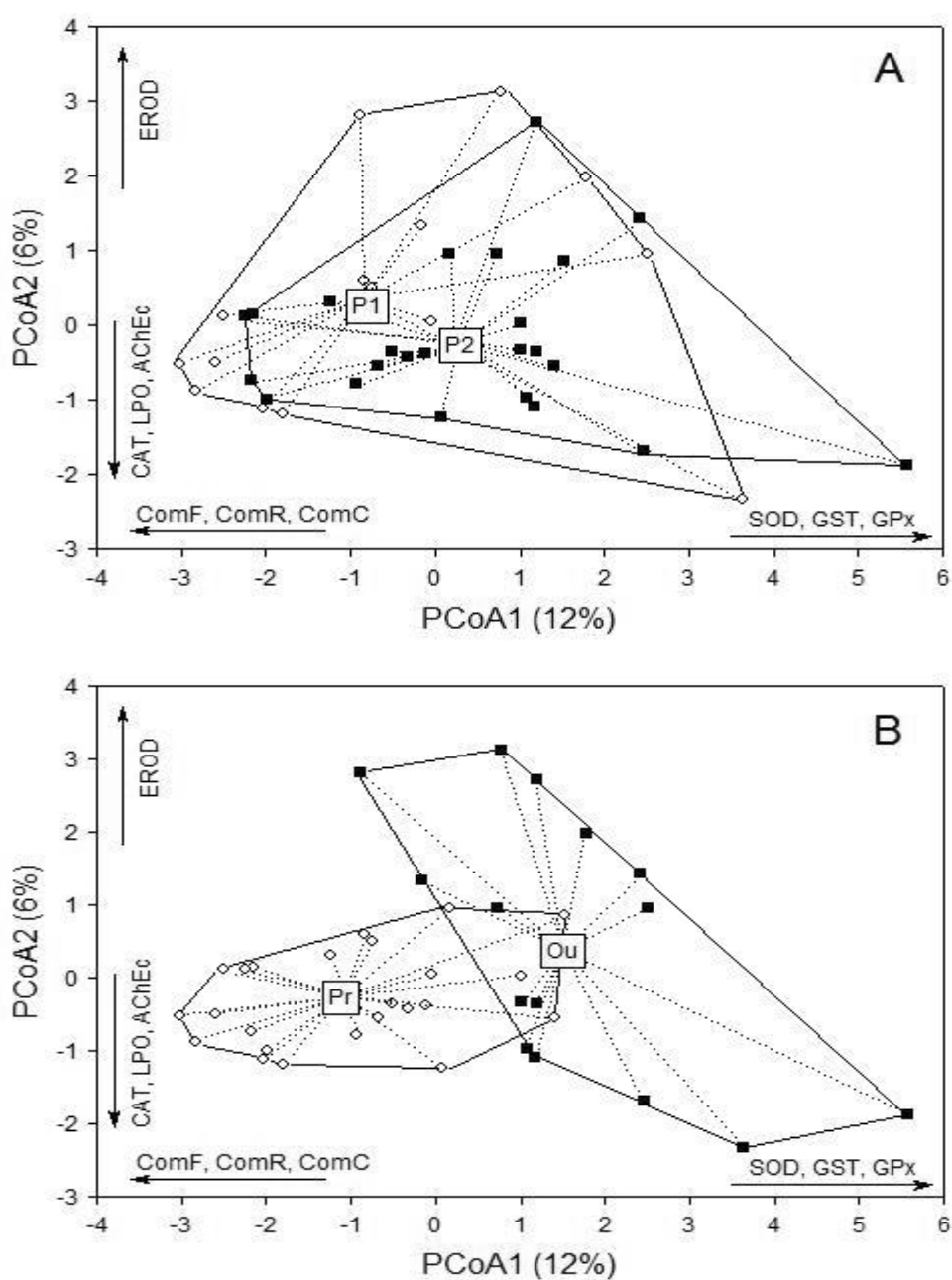


FIGURA 25 - Escores da PCoA mostrando a posição das unidades amostrais em relação aos pontos (A) e estações (B). A porcentagem de explicação de cada eixo, assim como os biomarcadores que mais estão relacionados com os eixos estão mostrados no gráfico.

A Figura 26 apresenta o esquema geral dos resultados observados para cada biomarcador, entre os pontos P1 e P2, na estação da primavera, e entre as estações primavera e outono, independente do ponto em análise.

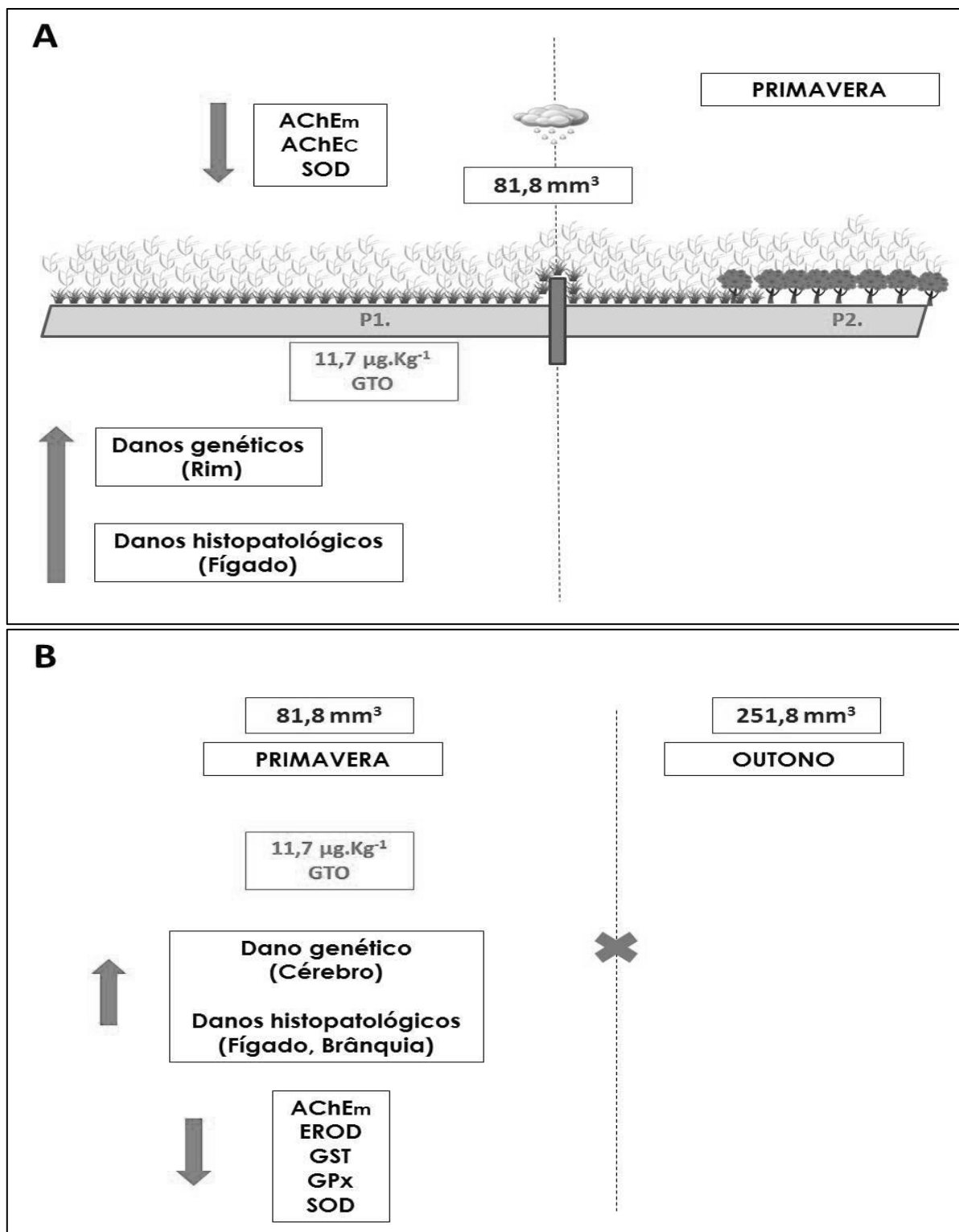


FIGURA 26 - Esquema geral dos resultados observados para cada biomarcador. **A:** pontos P1 e P2 na primavera; **B:** Primavera e Outono, independente do ponto em análise. As setas para cima indicam aumentos enquanto as setas para baixo indicam reduções.

6 DISCUSSÃO

Tratando-se especificamente das culturas de arroz irrigado, os danos à biota aquática de rios em decorrência da utilização de agrotóxicos torna-se mais evidente, devido à localização das culturas em áreas alagáveis adjacentes às margens de rios, o que possibilita o escoamento de grandes quantidades de agrotóxicos diretamente ao corpo hídrico. Estes por sua vez, podem interagir com outros compostos químicos, afetando a saúde de inúmeras espécies. Os efeitos danosos de inúmeros agrotóxicos – utilizados nas culturas de arroz – sobre diversas espécies de peixes, já são amplamente conhecidos através de estudos ecotoxicológicos (THINH *et al.*, 2018; SUBBURAJ *et al.*, 2018; TIAN *et al.*, 2018).

Períodos de chuva e seca atuam como importantes fatores no transporte desses compostos em direção aos corpos hídricos, favorecendo ou dificultando o processo de contaminação. Desta forma, a avaliação sazonal em estudos de biomonitoramento torna-se fundamental na avaliação da qualidade ambiental. Os dados pluviométricos registrados pela estação de Itapema demonstraram um índice pluviométrico menor na primavera, no mês de novembro de 2016 (81,8 mm³), e maior no outono, no mês de março de 2017 (251,8 mm³), indicando um menor volume do rio na estação da primavera, no período consecutivo a aplicação de diferentes tipos de agrotóxicos no cultivo do arroz. Vale apenas indicar que esta diferença no índice pluviométrico entre as estações demonstrou-se atípico para a região, caracterizada por chuvas regularmente distribuídas durante todo o ano, com precipitações médias em torno de 160 – 170 mm³ no mês de Março, e entre 150 – 160mm³ no mês de Novembro (PRATES *et al.*, 1986; PANDOLFO *et al.* 2002; WREGGE *et al.*, 2012). A convergência de fatores como, o baixo índice pluviométrico no mês de Novembro, o menor volume hídrico, a recente pulverização de agrotóxicos nas plantações de arroz nos meses anteriores, podem ter resultado em um aumento na concentração desses contaminantes no corpo hídrico no ponto de coleta a montante (P1), na primavera.

Essa hipótese é corroborada pela presença do herbicida glifosato detectada na amostra de sedimento em P1 (11,7 µg.kg⁻¹) no mês de Novembro de 2016, primavera. A maior exposição do ponto P1 ao escoamento proveniente dos quadros de cultivo, através dos canais de drenagem pode ter favorecido a entrada de um volume maior do contaminante no corpo hídrico, enquanto a presença da barragem

de acumulação de água tenha atuado dificultando a vazão do contaminante, favorecendo sua precipitação e subsequente adsorção pelo sedimento. Maqueda *et al.* (2017) afirmam que apesar de sua rápida absorção e degradação em contato com o solo através de sua decomposição por microrganismos, sua presença em lençóis freáticos e sedimentos está relacionada a exposição crônica do ambiente ao herbicida. A não detecção do herbicida no sedimento em ambos os pontos na estação do outono, talvez esteja relacionada aos processos de degradação microbiológica e de autodepuração do rio, ou mesmo, ao limite de quantificação do método utilizado. Diversos estudos de monitoramento ambiental tem identificado a presença do herbicida glifosato em sedimentos de rios próximos a áreas de agricultura intensiva na América do Sul, (Peruzzo *et al.* 2008; Aparicio *et al.* 2013; Bonansea *et al.* 2017; Ronco *et al.* 2016), como o observado neste estudo.

O glifosato uma vez incorporado ao sedimento de rios pode não só causar danos à biota ali presente, mas eventualmente ser resuspendido e carregado até os estuários e oceanos, afetando a biota estuarina e marinha (APARICIO *et al.*, 2013; GRANDCOIN *et al.*, 2017). A resolução CONAMA 357/2005 define uma concentração limite do herbicida glifosato de $280 \mu\text{g.L}^{-1}$ para águas doces de classe 3, na qual enquadra-se o Rio Perequê, no entanto, não estipula limites de concentração para sedimentos. O lançamento do herbicida glifosato nas águas do Perequê, em combinação com a presença de outros contaminantes, pode estar afetando não só a biota do rio, no trecho adjacente à área de cultivo do arroz irrigado, mas também as biotas estuarina e marinha localizadas a poucos quilômetros a jusante, uma vez carregados pela correnteza.

Outro problema encontra-se na localização do ponto de captação de água para abastecimento público realizado pela ETA de Porto Belo no ponto P1, haja vista que este ponto encontra-se mais exposto aos agrotóxicos oriundos dos canais de drenagem da área de cultivo de arroz irrigado. É provável que a água captada pela estação de abastecimento esteja contaminada pelo herbicida glifosato, além de outros agrotóxicos utilizados na cultura de arroz irrigado. É de amplo conhecimento que a falta de capacidade técnica dos sistemas de tratamento convencionais dificulta a eliminação desses contaminantes, resultando em um grave problema de saúde pública (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A portaria 518/04 do MS estabelece a concentração máxima permitida de 22 agrotóxicos, para água potável destinada ao abastecimento público, sendo de $500 \mu\text{g.L}^{-1}$ para o herbicida glifosato, um valor cinco mil vezes

maior que o limite de $0,1 \mu\text{g.L}^{-1}$, permitido nos países integrantes da Comunidade Econômica Européia.

O ponto P1 apresentou maiores valores do fator de condição, em relação ao ponto P2, independente das estações. Isso certamente está relacionado com as características do ponto P1, dentre elas a maior disponibilidade de habitats, decorrente da presença de gramíneas invasoras que se estendem em ambas as margens, propiciando refúgio a esses animais. No entanto, é justamente na margem esquerda que desembocam a maioria dos canais de drenagem da área de cultivo de arroz, expondo esses animais a maiores concentrações de agrotóxicos. Além disso, a presença da barragem causa o isolamento das populações ao longo do rio, reduzindo a competição intraespecífica e a pressão predatória. Esses fatores em conjunto propiciam a reserva energética e o ganho de peso desses animais. O menor valor do IHS no ponto P1, em relação ao ponto P2, na primavera certamente decorre da maior exposição desses animais aos agrotóxicos, como o glifosato, sobrecarregando as funções hepáticas. O menor valor no ponto P2 no outono, na comparação sazonal talvez esteja relacionado com a presença de outros tipos de contaminantes, como efluentes domésticos não tratados, trazidos rio acima com as subidas das marés.

A atividade da AChE muscular e cerebral foram menores no ponto P1, a montante da barragem de acumulação de água, em relação ao ponto P2, independente da estação, demonstrando a maior exposição dos organismos neste ponto aos contaminantes, dentre eles o glifosato. Também houve diferenças entre as estações, com menor atividade da AChE muscular e maior dano genético cerebral na estação da primavera, período de menor índice de chuvas, subsequente a época de pulverização de agrotóxicos nas plantações de arroz, realizada nos meses anteriores. Isso sugere que a presença do glifosato e outros agrotóxicos possam estar relacionados com diminuição da atividade da enzima, e aumento do dano genotóxico. Tratando-se especificamente do glifosato, vários autores têm demonstrado sua capacidade de inibir a atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral em peixes (SALBEGO *et al.*, 2010; GLUSCZAK *et al.*, 2006; GLUSCZAK *et al.*, 2007; MODESTO & MARTINEZ, 2010; MOURA *et al.*, 2017; SOBJAK *et al.*, 2017). A diminuição da atividade da acetilcolinesterase muscular e cerebral pode afetar a coordenação motora do animal, prejudicando seus movimentos e sua locomoção, enquanto os efeitos genotóxicos podem prejudicar o funcionamento

celular, a expressão gênica, gerando mutações, levando a carcinogênese, desta forma, comprometendo a sobrevivência desses animais. Trabalhos de biomonitoramento com diferentes espécies de peixes observaram a inibição da atividade das AChEs muscular e cerebral (Vieira *et al.* 2016; 2017), e da AChE muscular em *G. brasilienses* (LINDE-ARIAS *et al.* 2008; BENINCÁ *et al.* 2012), corroborando com os dados obtidos neste estudo.

A menor atividade da enzima SOD, o maior índice de lesão hepático e genotóxico no rim, coincidiram com a menor atividade da AChE muscular e cerebral, maior dano genético cerebral, no ponto P1, relação ao ponto P2 independente do ponto em análise. Também foi observado um efeito biológico de menor atividades da EROD, GST, GPx, na concentração da GSH, e um maior índice de lesão renal. A redução da atividade da SOD responsável pela degradação do ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), certamente favoreceu o estresse oxidativo, acarretando no aumento dos danos de membranas e de genotoxicidade. Embora não tenha havido diferença nos níveis de LPO, um efeito biológico maior pôde ser observado no ponto P1. Níveis elevados de ROS e/ou um sistema antioxidante deprimido, podem levar a oxidação de DNA, resultando em efeitos genotóxicos (GUILHERME *et al.* 2012).

Tratando-se especificamente das lesões hepáticas observadas, a necrose pode ocorrer através de diversos mecanismos celulares, que acabam perturbando a homeostasia de oxido-redução, como ruptura lisossomal, hipóxia tecidual e/ou aumento da peroxidação lipídica (OLIVEIRA RIBEIRO *et al.* 2002). A Infiltração leucocitária, junto com centros de melanomacrófagos está relacionada com a primeira linha de defesa contra xenobióticos e organismos patogênicos (BOLS *et al.*, 2001), enquanto a dilatação dos sinusóides encontra-se associada a distúrbios circulatórios, como a hiperemia venosa (YANCHEVA *et al.*, 2014; CHUGH *et al.*, 2011). A acumulação lipídica sugere a perda da função hepática, com a alteração do metabolismo lipídico pelos hepatócitos (TAKASHIMA & HIBIYA, 1995; ARELLANO; STORCH; SARASQUETE; 1999). O menor IHS, a menor atividade das enzimas de biotransformação e estresse oxidativo certamente resultaram nos danos teciduais observados no tecido hepático. Danos histopatológicos, como centros de melanomacrófagos, necrose, e infiltração leucocitária, no fígado de *G. brasiliensis* semelhantes aos observados neste estudo foram descritos por Benincá *et al.* (2012), em um biomonitoramento de duas lagoas litorâneas, contaminadas por efluentes de

culturas de arroz, em Laguna, e Osório *et al.* (2014), em um estudo de biomonitoramento no rio Tubarão, ambos em Santa Catarina.

Na comparação sazonal a redução das atividades da EROD, GST, GPx e SOD, e o maior índice de lesão hepático e branquial coincidiram com a menor atividade da AChE muscular na primavera, em relação ao outono, independente do ponto em análise. Esses resultados evidenciam que os animais estão mais expostos aos contaminantes durante a estação da primavera, causando a inibição das enzimas de biotransformação e de estresse oxidativo, o que resulta em danos teciduais e genotóxicos observados. Segundo Piancini *et al.* (2015), diversos compostos comumente utilizados em culturas agrícolas, podem causar danos ao DNA, seja pela interação direta de sua molécula e seu metabólito com o material genético, ou como consequência secundária do estresse oxidativo, comprometendo a saúde do animal. Alterações no epitélio lamelar e hiperplasias no tecido branquial são exemplos de mecanismos de defesas, dificultando a absorção do contaminante oriundo do ambiente externo para a corrente sanguínea (CAMARGO & MARTINEZ, 2007), garantindo a integridade deste órgão responsável por importantes funções, como respiração, osmorregulação e excreção (GOMES *et al.*, 2012). Danos como hiperplasia e elevação do epitélio respiratório em brânquias de *G. brasiliensis*, como os observados neste estudo foram relatados por Romão *et al.* (2006), em um lago em São José dos Pinhás, Paraná e por Nascimento *et al.* (2012), no rio Paraíba do Sul, Rio de Janeiro, ambos localizados próximos de áreas agrícolas.

Na análise de alterações morfológicas nucleares em eritrócitos foram observadas alterações dos tipos “blebed”, “lobed”, “notched” e “vacuolated”, no entanto, apenas a alteração do tipo “lobed” apresentou uma frequência maior no ponto P1, em relação ao ponto P2, no outono, e maior no ponto P1, no outono, na comparação sazonal. Essas alterações indicam uma possível resposta tardia à exposição desses animais ocorrida na primavera, demonstrando também a maior exposição do ponto P1 aos agrotóxicos, dentre eles o glifosato.

A PERMANOVA mostrou que há diferença dos biomarcadores, de forma geral, entre pontos e entre estações, mas o efeito do ponto não interage com o efeito da estação. Pelos valores de R^2 , é possível inferir que a diferença entre estações é mais forte (0,20) que a diferença entre pontos (0,050), considerando o conjunto de biomarcadores. De fato, isso é corroborado com a posição dos escores em uma PCoA (FIGURA 25). Apesar da PCoA não sumarizar bem os dados visto a baixa

porcentagem de explicação dos eixos (12% e 6% para o eixo 1 e 2; próximos do modelo de Broken-Stick: 11,3% e 9% respectivamente), fica claro que as unidades amostrais diferem mais entre estações do que entre pontos.

Apesar de sua importância para o abastecimento público de água, o Rio Perequê caracteriza-se como um sistema hídrico altamente impactado, devido principalmente à ocupação irregular de suas margens, desmatamento da vegetação ciliar nativa, ocorrência de processos erosivos em ambas as margens, assoreamento de seu leito, e sobre tudo pela contaminação de suas águas, em decorrência do lançamento de efluentes domésticos não tratados, e agrotóxicos oriundos das plantações de arroz irrigado, localizadas a margem esquerda do rio. Os resultados encontrados sugerem que os contaminantes presentes no Rio Perequê estão afetando de forma significativa a saúde dos organismos expostos, gerando um sinal de alerta sobre possíveis danos a biota e a saúde da população humana.

7 CONCLUSÃO

O Rio Perequê apresenta contaminação por agrotóxicos provenientes da agricultura de arroz irrigado, na estação da primavera, e principalmente no ponto a montante da barragem de acumulação de água, próximo ao local de captação de água para o abastecimento dos municípios de Porto Belo e Bombinhas, indicando um potencial risco de saúde pública.

Observou-se a melhor higidez do peixe *G. brasiliensis* por meio do fator de condição no ponto P1, em relação ao ponto P2, independente da estação em análise. Entretanto, observou-se uma pior higidez hepática por meio do índice hepatossomático no ponto P1, na primavera.

Observou-se efeitos neurotóxicos pela inibição da atividade da AChE muscular, na primavera na comparação sazonal, e pela inibição da atividade da AChE muscular e cerebral no ponto P1 na primavera.

Observou-se alterações no sistema de biotransformação e antioxidante com reduções na atividade das enzimas EROD, GST, GPx e SOD, na estação da primavera, na comparação sazonal.

Não foram observadas alterações nas concentrações de metalotioneínas no fígado do peixe *G. brasiliensis*.

Observou-se efeito genotóxico hepática e renal, no ponto P1, na primavera, além de genotoxocidade cerebral, hepático e branquial, na estação da primavera, na comparação sazonal.

Observou-se uma variação pontual e sazonal nas respostas dos peixes aos biomarcadores, apresentando efeitos tóxicos em múltiplos órgãos e tecidos, prejudicando a saúde e sobrevivência desses animais.

Observaram-se danos histopatológicos no tecido hepático no ponto P1, na primavera. Também se observaram danos branquial e hepático, na estação da primavera, na comparação sazonal.

Evidencia-se a necessidade dos órgãos municipais, estaduais, e federais atuarem em conjunto com os diversos atores da sociedade civil em prol da recuperação e conservação do Rio Perequê.

REFERÊNCIAS

ABELHA, M. C. F.; GOULAR, E. Oportunismo trófico de *Geophagus brasiliensis* (Quoy & Gaimard, 1824) (Osteichthyes, Cichlidae) no reservatório de Capivari, Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Biological Sciences**. v.26, n.1, p.37-45, 2004.

AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods Enzymology**, v.105, p.121-126, 1984

AGBOHESSI, P. T.; TOKO, I. I.; OUÉDRAOGO, A.; JAUNIAUX, T.; MANDIKI, S.N.M.; KESTEMONT, P. Assessment of the health status of wild fish inhabiting a cotton basin heavily impacted by pesticides in Benin (West Africa). **Science of the Total Environment**, v.506-507, p.567-584, 2015.

AGROFIT - Sistema de agrotóxicos fitossanitários. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Disponível em: <http://agrofit.agricultura.gov.br/agrofit_cons/principal_agrofit_cons>. Acesso em: 20 out. 2017.

ÁGUAS DE ITAPEMA, Levantamento de lançamento de efluentes no Rio Perequê e do Rio da Fita. **Relatório técnico, Ecolibra Engenharia, Projetos e Sustentabilidade LTDA**, Balneário Camboriú, Fevereiro de 2013.

AI-SABTI, K.; METCALFE, C. D. Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water. **Mutation Research**, v.343, p.121-135, 1995.

ALMEIDA, M. D.; CAVENDISH, T. A.; BUENO, P. C.; ERVILHA, I. C.; GREGÓRIO, L. D. S.; KANASHIRO, N. B. O.; ROHLFS, D. B.; CARMO, T. F. M. A flexibilização da legislação brasileira de agrotóxicos e os riscos à saúde humana: análise do Projeto de Lei nº 3.200/2015. **Caderno de Saúde Pública**, v.33, ed.7, 2017.

ANDERSON, M. J. A new method for non-parametric multivariate analysis of variance. **Austral Ecology**, v.26, p.32-46, 2001.

ANSARI, R. A.; RAHMAN, S.; KAUR, M.; ANJUM, S.; RAISUDDIN, S. In vivo cytogenetic and oxidative stress-inducing effects of cypermethrin in freshwater fish, *Channa punctata* Bloch. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.74, p.150-156, 2011.

APARICIO, V. C.; DE GERÓNIMO, E.; MARINO, D.; PRIMOST, J.; CARRIQUIRIBORDE, P.; COSTA, J. L. Environmental fate of glyphosate and aminomethylphosphonic acid in surface waters and soil of agricultural basins. **Chemosphere**, v.93, p.1866-1873, 2013.

ARAÚJO, I. M. M.; OLIVEIRA, A. G. R. C. Agronegócio e agrotóxicos: impactos à saúde dos trabalhadores agrícolas no nordeste brasileiro. **Trabalho, Educação e Saúde**, v. 15 n. 1, p. 117-129, 2017.

ARELLANO, J. M.; STORCH, V.; SARASQUETE, C. Histological changes and copper accumulation in liver and gills of the Senegales sole, *Solea senegalensis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.44, n.1, p.62-72, 1999.

ARIAS, A. R. L.; SANTO S, V. G.. Metalotioneína: processos celulares e moleculares. **Cadernos Saúde coletiva**, Rio de Janeiro, v.16, Issue 4, p.701-716, 2008.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v.87, p.949-968, 2013.

BENBROOK, C. M. Trends in glyphosate herbicide use in the United States and globally. **Environmental Sciences Europe**, v.28, n.3, 2016.

BENEDETTI, M.; MARTUCCIO, G.; FATTORINI, D.; CANAPA, A.; BARUCCA, M.; NIGRO, M.; REGOLI, F. Oxidative and modulatory effects of trace metals on metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in Antarctic fish *Trematomus bernacchii*. **Aquatic Toxicology**, v.85, p.167-175, 2007.

BENINCÁ, C.; RAMSDORF, W.; VICARI, T.; RIBEIRO, C. A. O.; DE ALMEIDA, M. I.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. Chronic genetic damages in *Geophagus brasiliensis* exposed to anthropic impact in Estuarine Lakes at Santa Catarina Coast–Southern of Brazil. **Environmental Monitoring and Assessment**, v.184, p.2045-2056, 2012.

BERNET, D.; SCHMIDT, H.; MEIER, W.; BURKHARDT-HOLM, P.; WAHLI, T. Histopathology in fish: proposal for a protocol to assess aquatic pollution. **Journal of Fish Diseases**, v. 22, Issue 1, p.25–34, 1999.

BERTI, A.P; DÜSMAN, E; SOARES, L. C.; GRASSI, L. E. A. Efeitos da contaminação do ambiente aquático por óleos e agrotóxicos. **SaBios: Revista de Saúde e Biologia**, v.4, n.1, p.45-51, 2009.

BESSEGATO, G. G.; SANTOS, V. P.; LINDINO, C. A. Degradação fotoeletroquímica do herbicida bentazona sobre eletrodos de carbono modificados por TiO₂. **Química Nova**, v.35, n.2, p.332-336, 2012.

BEATTY, S. J.; MORGAN, D. L.; KELEHER, J.; ALLEN, M. G.; SARRE, G. A. The tropical South American cichlid, *Geophagus brasiliensis* in Mediterranean climatic south-western Australia. **Aquatic Invasions**, Issue 1, v.8, p.21–36, 2013.

BIRNIE-GAUVIN, K.; COSTANTINI, D.; COOKE, S. J.; WILLMORE, W. G. A comparative and evolutionary approach to oxidative stress in fish: A review. **Fish and Fisheries**, v.18, p.928-942, 2017.

BOLS, N. C.; BRUBACHER, J. L.; GANASSIN, R. C.; LEE, L. E. Ecotoxicology and innate immunity in fish. **Developmental & Comparative Immunology**, v.25, p.853-873, 2001.

BONANSEA, R. I.; FILIPPI, I.; WUNDERLIN, D. A.; MARINO, D. J. G.; AMÉ, M. V. The Fate of Glyphosate and AMPA in a Freshwater Endorheic Basin: An Ecotoxicological Risk Assessment. **Toxics**, v.6, n.3; 2017.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, Issues 1–2, p.248-254, 1976.

BRAHAM, R.P.; BLAZER, V.S.; SHAW, C.H.; MAZIK, P.M. Micronuclei and Other Erythrocyte Nuclear Abnormalities in Fishes from the Great Lakes Basin, USA. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, n.58, p.570-581, 2017.

BRASIL, Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. LEI Nº 7.802, DE 11 DE JULHO DE 1989. Dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 11 de julho de 1989.

BRASIL, Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. LEI Nº 9.433, DE 8 DE JANEIRO DE 1997. Institui a Política Nacional de Recursos Hídricos, cria o Sistema Nacional de Gerenciamento de Recursos Hídricos, regulamenta o inciso XIX do art. 21 da Constituição Federal, e altera o art. 1º da Lei nº 8.001, de 13 de março de 1990, que modificou a Lei nº 7.990, de 28 de dezembro de 1989. Brasília, 8 de janeiro de 1997.

BRASIL, Casa Civil Subchefia para Assuntos Jurídicos. DECRETO Nº 4.074, DE 4 DE JANEIRO DE 2002. Regulamenta a Lei no 7.802, de 11 de julho de 1989, que dispõe sobre a pesquisa, a experimentação, a produção, a embalagem e rotulagem, o transporte, o armazenamento, a comercialização, a propaganda comercial, a utilização, a importação, a exportação, o destino final dos resíduos e embalagens, o registro, a classificação, o controle, a inspeção e a fiscalização de agrotóxicos, seus componentes e afins, e dá outras providências. Brasília, 4 de janeiro de 2002.

BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância em Saúde Coordenação-Geral de Vigilância em Saúde Ambiental. PORTARIA Nº 2.914, DE 12 DE DEZEMBRO DE 2011. Dispõe sobre os procedimentos de controle e de vigilância da qualidade da água para consumo humano e seu padrão de potabilidade. Brasília 12 de dezembro de 2011.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO N. 357, DE 17 DE MARÇO DE 2005. Dispõe sobre a classificação dos corpos de água e diretrizes ambientais para o seu enquadramento, bem como estabelece as condições e padrões de lançamento de efluentes, e dá outras providências. **Publicada no DOU nº 053**, de 18/03/2005.

BRASIL, MINISTÉRIO DO MEIO AMBIENTE, CONSELHO NACIONAL DO MEIO AMBIENTE-CONAMA. RESOLUÇÃO CONAMA no 396, de 3 de abril de 2008.

Dispõe sobre a classificação e diretrizes ambientais para o enquadramento das águas subterrâneas e dá outras providências. **Publicada no DOU nº 66**, de 7 de abril de 2008.

BUUS, D. F.; NESSIMIAN, J. L.; BAPTISTA, D. F. Bases conceituais para a aplicação de biomonitoramento em programas de avaliação da qualidade da água de rios. **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, Issue 2, p.465-473, 2003.

BUUS, D. F.; OLIVEIRA, R. B.; BAPTISTA, D. F. Monitoramento biológico dos ecossistemas aquáticos continentais. **Oecologia Brasiliensis**, v.12, Issue 3, p.339-245, 2008.

BURKE, M. D.; MAYER, R. T. Ethoxyresorufin: direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3-methylcholanthrene. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 2, p. 583-585, 1971.

CALADO, S. L. M.; WOJCIECHOWSKI, J.; SANTOS, G. S.; MAGALHÃES, V. F.; PADIAL, A. A.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Neurotoxins in a water supply reservoir: An alert to environmental and human health. **Toxicon**, v.126, p.12-22, 2017.

CAMARGO, M. M. P.; MARTINEZ, C. B. R. Histopathology of gills, kidney and liver of a Neotropical fish caged in an urban stream. **Neotropical Ichthyology**, v.5, n.3, p.327-336, 2007.

CARRASCO, K. R., TILBURY, K. L.; MYERS, M. S. Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects. **Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences**, v. 47 p. 2123-2136, 1990.

CETESB. **Guia nacional de coleta e preservação de amostras: água, sedimento, comunidades aquáticas e efluentes líquidos** / Companhia Ambiental do Estado de São Paulo; Organizadores: Carlos Jesus Brandão ... [et al.]. -- São Paulo: CETESB; Brasília: ANA, 2011.

CESTARI, M. M.; LEMOS, P. M. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; COSTA, J. R. M. A.; PELLETIER, E.; FERRARO, M. V. M.; MANTOVANI, M. S.; FENOCCHIO, A. S. Genetic damage induced by trophic doses of lead in the neotropical fish *Hoplias malabaricus* (Characiformes, Erythrinidae) as revealed by the comet assay and chromosomal aberrations. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.2, 2004.

CHAFFAI, A. H. Usefulness of Bioindicators and Biomarkers in Pollution Biomonitoring. **International Journal of Biotechnology for Wellness Industries**, v.3, p.19-26, 2014.

CHOVANEK, A.; HOFER, R.; SCHIEMER, F. Chapter 18. Bioindicators and biomarkers. In: **Fish as bioindicators**. B.A. Markert, A.M. Breure, H.G. Zechmeister, (editors), Elsevier Science Ltd, 2003.

COLLINS, A.; DUŠINSKÁ, M.; FRANKLIN, M.; SOMOROVSKÁ, M.; PETROVSKÁ, H.; DUTHIE, S.; FILLION, L.; PANAYIOTIDIS, M.; RAŠLOVÁ, K.; VAUGHAN, N. Comet assay in human biomonitoring studies: Reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 30, Issue 2, p.139-146, 1997.

COLLINS, A. R. The Comet Assay for DNA Damage and Repair Principles, Applications, and Limitations. **Molecular Biotechnology**, v.26, 2004.

COLLINS, A.; KOPPEN, G.; VALDIGLESIAS, V.; DUSINSKA, M.; KRUSZEWSKI, M.; MØLLER, P.; ROJAS, E.; DHAWAN, A.; BENZIE, I.; COSKUN, E.; MORETTI, M.; SPEIT, G.; BONASSI, S. The comet assay as a tool for human biomonitoring studies: The ComNet Project. **Mutation Research**, n.759, p.27-39, 2014.

COPATTI, C. E., GARCIA, L. O.; BALDISSEROTTO, B. Revisão Temática. Revisão sobre o impacto de agroquímicos da cultura de arroz em peixes. **Biota Neotropica**, v.9, n.4, 2009.

CROUCH, R. K.; GANDY, S. E.; KIMSEY, G. The inhibition of islet superoxide dismutase by diabetogenic drugs. **Diabetes**, v.30, p.235-41, 1981.

CUTARELLI, M. P.; PIRES, J. D. T. S.; SMITH, R. E.; MEREGE, R. B. Oficina de capacitação no uso de sig aplicado a caracterização de bacias hidrográficas: estudos para criação de Unidade de Conservação em Itapema/SC. **XVIII Simpósio Brasileiro de Recursos Hídricos**, 2009.

D'AMATO, C.; TORRES, J.P.M.; MALM, O. DDT (dicloro difenil tricloroetano): toxicidade e contaminação ambiental – uma revisão. **Química Nova**, v. 25, n. 6, p.995-1002, 2002.

DELLAMATRICE, P. M.; MONTEIRO, R. T. R. Principais aspectos da poluição de rios brasileiros por pesticidas. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.12, p.1296-1301, 2014.

DÍAZ, J. E. S.; LÓPEZ, E. L. Chapter 4 - Freshwater Fish as Sentinel Organisms: From the Molecular to the Population Level, a Review. In: **New Advances and Contributions to Fish Biology**, (ed.) Hakan Türker, InTech, 2013.

DUKE, S.O. Perspectives on transgenic, herbicide-resistant crops in the United States almost 20 years after introduction. **Pest Management. Science**, v.71, p.652–657, 2015.

ELLMAN, G. L.; COUTNEY, K. O.; ANDRES, V.; FEATHERSTONE, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Biochemical Pharmacology**, v. 7, p. 88-95, 1961.

EMBRAPA - Circular técnica 67. **Agrotóxicos no Cultivo do Arroz no Brasil: análise do consumo e medidas para reduzir o impacto ambiental negativo**. BARRIGOSI, J. A. F.; LANNA, A. C.; FERREIRA, E. (Autores), 2004.

FATMA, Fundação do Meio Ambiente – FATMA. PORTARIA Nº 017/02 – FATMA DE 18/04/2002. Estabelece os Limites Máximos de Toxicidade Aguda para efluentes de diferentes origens e dá outras providências. **Publicada no DOSC** de 23/04/2002.

FANG, F.; WEI, R.; LIU, X. Novel pre-column derivatisation reagent for glyphosate by high-performance liquid. **International Journal of Environmental Analytical Chemistry**, v.94, Issue 7, 2014.

FERRARO, M. V. M.; FENOCCHIO, A. S.; MANTOVANI, M. S.; RIBEIRO, C. O.; CESTARI, M. M. Mutagenic effects of tributyltin and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration tests. **Genetics and Molecular Biology**, v.27, n.1, 2004.

FUENTES-RIOS, D.; ORREGO, R.; RUDOLPH, A.; MENDONZA, G.; GAVILÁN, J. F.; BARRA, R. EROD activity and biliary fluorescence in *Schroederichthys chilensis* (Guichenot 1848): biomarkers of PAH exposure in coastal environments of the South Pacific Ocean. **Chemosphere**, v.61, Issue 2, p.192-199, 2005.

GAVRILESCU, M.; DEMNEROVA, K.; AAMAND, J.; AGATHOS, S.; FAVA, F. Emerging pollutants in the environment: present and future challenges in biomonitoring, ecological risks and bioremediation. **New Biotechnology**, v. 32, n. 1, 2015.

GEORGE, S.G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish. In: Malins, D.C., Ostrander, G.K. (Eds.), **Aquatic Toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular perspectives**. Lewis Publishers, CRC press, p.37-85, 1994.

GERIG, B. S.; CHALONER, D. T.; JANETSKI, D. J.; MOERKE, A. H.; REDISKE, R. R.; O'KEEFE, J. P.; PITTS, D. A. A.; LAMBERTI, G. A. Environmental context and contaminant biotransport by Pacific salmon interact to mediate the bioaccumulation of contaminants by stream-resident fish. **Journal of Applied Ecology**, p.1-14, 2018.

GHISI, N. C.; OLIVEIRA, E. C.; GUILOSKI, I.C.; LIMA, S. B.; SILVA DE ASSIS, H. C.; LONGHI, S. J.; PRIOLI, A. J. Multivariate and integrative approach to analyze multiple biomarkers in ecotoxicology: A field study in Neotropical region. **Science of the Total Environment**, v.609, p.1208-1218, 2017.

GILL, J. P. K.; SETHI, N.; MOHAN, A. Analysis of the glyphosate herbicide in water, soil and food using derivatising agentes. **Environmental Chemistry Letters**, v.15, p.85–100, 2017.

GRANZIERA, M. L. M.; GRANZIERA, B. M. Desafios na gestão das águas subterrâneas. **Revista Águas Subterrâneas**, v.28, Suplemento - Anais do XVIII Congresso Brasileiro de Águas Subterrâneas. 2014.

GUILOSKI, I. C.; ROSSI, S. C.; DA SILVA, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Insecticides biomarker responses on a freshwater fish *Corydoras paleatus* (Pisces: Callichthyidae). **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v.48, Issue 4, 2013.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; CRESTANI, M.; FONSECA, M. B.; PEDRON, F. A.; DUARTE, M. F.; VIEIRA, V. L. P. Effect of glyphosate herbicide on acetylcholinesterase activity and metabolic and hematological parameters in piava (*Leporinus obtusidens*). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.65, p.237-241, 2006.

GLUSCZAK, L.; MIRON, D. S.; MORAES, B. S.; SIMÕES, R. R.; SCHETINGER, M. R. C.; MORSCH, V. M.; LORO, V. L. Acute effects of glyphosate herbicide on metabolic and enzymatic parameters of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.146, p.519-524, 2007.

GOMES, I. D.; NASCIMENTO, A. A.; SALES, A.; ARAÚJO, F. G. Can fish gill anomalies be used to assess water quality in freshwater neotropical systems? **Environmental Monitoring and Assessment**, v.184, n.9, p.5523–5531, 2012.

GOMES, M. P.; SMEDBOL, E.; CHALIFOUR, A.; HÉNAULT-ETHIER, L.; LABRECQUE, M.; LEPAGE, L.; LUCOTTE, M.; Juneau, P. Alteration of plant physiology by glyphosate and its by-product aminomethylphosphonic acid: an overview. **Journal of Experimental Botany**, v.65, n.17, p. 4691–4703, 2014.

GONÇALVES, F.; MARQUES, A. P. V.; BATISTA, A.; LIMA, J. D. Evolução da legislação brasileira sobre recursos hídricos. **XVII Simpósio Brasileiro de Geografia Física Aplicada e I Congresso Nacional de Geografia Física**. v.1, Unicamp, Campinas, 2017.

GOWER, J. C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. **Biometrika**, v.53, Issue 3-4, p.325–338, 1966.

GRANDCOIN, A.; PIEL, S.; BAURES, E. AminoMethylPhosphonic acid (AMPA) in natural waters: Its sources, behavior and environmental fate. **Water Research**, v.117, p.187-197, 2017.

GRAY, J. S.. Biomagnification in marine systems: the perspective of an ecologist. **Marine Pollution Bulletin**, v.45, p.46-52, 2002.

GRÜTZMACHER, D. D.; GRÜTZMACHER, A. D.; AGOSTINETTO, D.; LOECK, A. E.; ROMAN, R.; PEIXOTO, S. C.; ZANELLA, R. Monitoramento de agrotóxicos em dois mananciais hídricos no sul do Brasil. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.12, n.6, p.632–637, 2008.

GUILHERME, S.; GAIVÃO, I.; SANTOS, M. A.; PACHECO, M. DNA damage in fish (*Anguilla anguilla*) exposed to a glyphosate-based herbicide – Elucidation of organ-specificity and the role of oxidative stress. **Mutation Research**, v.743, p.1-9, 2012.

GUILHERME, S.; SANTOS, M.A.; GAIVAO, I.; PACHECO, M. Genotoxicity evaluation of the herbicide Garlon and its active ingredient (Triclopyr) in fish (*Anguilla anguilla* L.) Using the Comet Assay. **Environmental Toxicology**, v.30, Issue 9, p.1073-1081, 2015.

GÜNGÖRDÜ, A.; ERKMEN, B.; KOLANKAYA, D. Evaluation of spatial and temporal changes in biomarker responses in the common carp (*Cyprinus carpio* L.) for biomonitoring the Meric Delta, Turkey. **environmental toxicology and pharmacology**, v.33, Issue 3, p.431-439, 2012.

HAFEMAN, D. G.; SUNDE, R. A.; HOEKSTRA, W. C. Effect of dietary selenium on erythrocyte and liver glutathione peroxidase in the rat. **Journal of nutrition**, v. 104, n. 4, p. 580-587, 1974.

HEDDLE, J. A. A rapid in vivo test for chromosomal damage. **Mutation Research**, v.18, Issue 2, p.187-190, 1973.

HOSHINA, M. M.; ANGELIS, D. F.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of micronucleus and nuclear alterations in fish (*Oreochromis niloticus*) by a petroleum refinery effluent. **Mutation Research**, v.656, p.44-48, 2008.

HUBER, R.; OTTO, S. Environmental Behavior of Bentazon Herbicide. In: **Reviews of Environmental Contamination and Toxicology**, Ware, G. W. (Editor), v. 137, Springer-Verlag, New York, 1994.

JACOBI, P. R.; FRACALANZA, A. P. Comitês de bacias hidrográficas no Brasil: desafios de fortalecimento da gestão compartilhada e participativa. **Desenvolvimento e Meio Ambiente**, v.11-12, p.41-49, Editora UFPR, 2005.

JAFFER, N. S.; RABEE, A. M.; AL-CHALABI, S. M. M. Biochemical and hematological parameters and histological alterations in fish *Cyprinus carpio* L. as biomarkers for water pollution with chlorpyrifos. **Journal Human and Ecological Risk Assessment: An International Journal**, v. 23, Issue 3, 2017.

JARA, V. C.; WIEGAND, C. Biotransformation and antioxidant enzymes of *Lumbriculus variegatus* as biomarkers of contaminated sediment exposure. **Chemosphere**, v.70, p.1879-1888, 2008.

JESUS, T. B.; CARVALHO, C. E. V. Utilização de biomarcadores em peixes como ferramenta para avaliação de contaminação ambiental por mercúrio (Hg). **Oecologia brasiliensis**, v.12, Issue 4, p.680-693, 2008.

JIANG, Z-Y.; HUNT, J. V.; WOLFF, S. P. Ferrous ion oxidation in the presence of xilenol orange for detection of lipid hydroperoxide in low density lipoprotein. **Analytical Biochemistry**, v.202, p.384-389, 1992.

KEEN, J. H.; HABIG, W. H.; JAKOBY, W. B. Mechanism for several activities of the glutathione S-transferases. **Journal of Biological Chemistry**, v. 251, p.6183-6188, 1976.

KLEINOW, K. M.; MELANCON, M. J.; LECH, J. J. Biotransformation and Induction: Implications for Toxicity, Bioaccumulation and Monitoring of Environmental Xenobiotics in Fish. **Environmental Health Perspectives**, v.71, p.105-119, 1987.

KOUSAR, S.; JAVED, M.. Diagnosis of metals induced DNA damage in fish using comet assay. **Pakistan Veterinary Journal**, v.35, n.2, p.168-172, 2015.

LANFRANCHI, A. L.; MENONE, M. L.; MIGLIORANZA, K. S. B.; JANOT, L. J.; AIZPU'N, J. E.; MORENO, V. J.. Striped weakfish (*Cynoscion guatucupa*): A biomonitor of organochlorine pesticides in estuarine and near-coastal zones. **Marine Pollution Bulletin**, v. 52, p.74-80, 2006.

LAW, P. K. S; GRAY, J. S. The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. **Marine Pollution Bulletin**, v.46, Issue 2, p.182-186, 2003.

LI, L.; ZHENG, B.; LIU, L. Biomonitoring and Bioindicators Used for River Ecosystems: Definitions, Approaches and Trends. **Procedia Environmental Sciences**, v.2, p.1510-1524, 2010.

LI, N.; LEE, H. K. Sample Preparation Based on Dynamic Ion-Exchange Solid-Phase Extraction for GC/MS Analysis of Acidic Herbicides in Environmental Waters. **Analytical Chemistry**, v.72, n.14, p. 3077–3084, 2000.

LIBÂNIO, P. A. C.; CHERNICHARO, C. A. L.; NASCIMENTO, N. O. A dimensão da qualidade de água: avaliação da relação entre indicadores sociais, de disponibilidade hídrica, de saneamento e de saúde pública. **Engenharia Sanitária Ambiental**, V.10, n.3, p.219-228, 2005.

LIEBEL, S.; TOMOTAKE, M. E. M.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Fish histopathology as biomarker to evaluate water quality. **Ecotoxicology and Environmental Contamination**, v. 8, n. 2, p.09-15, 2013.

LINDE-ARIAS, A. R.; INÁCIO, A. F.; NOVO, L. A.; ALBURQUERQUE, C.; MOREIRA, J. C. Multibiomarker approach in fish to assess the impact of pollution in a large Brazilian river, Paraíba do Sul. **Environmental Pollution**, v.156, p.974-979, 2008.

LÓPEZ-PIÑEIRO, A.; PEÑA, D.; ALBARRÁN, A.; SÁNCHEZ-LLERENA, J.; RATONUNES, J. M.; ROZAS, M. A. Behaviour of bentazon as influenced by water and tillage management in rice-growing conditions. **Pest Management Science**, v.73, p.1067–1075, 2017.

LUO, Y.; GUO, W.; NGO, H. H.; NGHIEM, L. D.; HAI, F. I.; ZHANG, J.; LIANG, S.; WANG, X. C. A review on the occurrence of micropollutants in the aquatic environment and their fate and removal during wastewater treatment. **Science of the Total Environment**, v.473–474, p.619–641, 2014.

LU, G. H.; WANG, C.; ZHU, Z. The Dose–Response Relationships for EROD and GST Induced by Polyaromatic Hydrocarbons in *Carassius auratus*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.82, p.194-199, 2009.

LUSHCHAK, O. V.; KUBRAK, O. I.; STOREY, J. M.; STOREY, K. B.; LUSHCHAK, V. I. Low toxic herbicide Roundup induces mild oxidative stress in goldfish tissues. **Chemosphere**, v.76, Issue 7, p.932-937, 2009.

MAGALHÃES, D. P.; FILHO, A.S.F. A ecotoxicologia como ferramenta no biomonitoramento de ecossistemas aquáticos. **Oecologia brasiliensis**, v.12, Issue 3, p.355-381, 2008.

MAQUEDA, C.; UNDABEYTIA, T.; VILLAYERDE, J.; MORILLO, E. Behaviour of glyphosate in a reservoir and the surrounding agricultural soils. **Science of the Total Environment**, v.593-594, p.787-795, 2017.

MARTÍNEZ-ÁLVAREZ, R. M.; AMALIA E. MORALES, A. E.; SANZ, A. Antioxidant defenses in fish: Biotic and abiotic factors. **Reviews in Fish Biology and Fisheries**, v.15, p.75-88, 2005.

MARTINI, L. F. D.; CALDAS, S. S.; BALZAN, C. M.; BUNDT, A. D.; C.; PRIMEL, A. G.; AVILA, L. A. Risk assessment of surface and groundwater contamination by the rice pesticides. **Ciência Rural**, v.42, p.1715-1721, 2012.

MATIAS, V. A.; TAMANAHA, M. S. Monitoramento dos agrotóxicos quinclorac e carbofuran no rio camboriú, município de camboriu, Santa Catarina. **REA – Revista de estudos ambientais** (Online) v.18, n.1, p.30-45, 2016.

MCHUGH, K. J.; SMIT, N. J.; VAN VUREN, J. H. J.; VAN DYK, J. C.; BERVOETS, L.; COVACI, A.; WEPENER, V. A histology-based fish health assessment of the tigerfish, *Hydrocynus vittatus* from a DDT- affected area. **Physics and Chemistry of the Earth**, v.36, n.14-15, p.895-904, 2011.

MELA, M.; M.A.F. RANDIA, VENTURA, D. F.; CARVALHO, C. E. V.; PELLETIER, E.; OLIVEIRA RIBEIRO, C. A. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.68, Issue 3, p.426-435, 2007.

MERCURIO, P.; FLORES, F.; MUELLER, J. F.; CARTER, S.; NEGRI, A. P. Glyphosate persistence in seawater. **Marine Pollution Bulletin**, v.85, p.385–390, 2014.

MESCHIATTI, A. J. Alimentação da comunidade de peixes de uma lagoa marginal do rio Mogi-Guaçu, SP. **Acta Limnologica Brasiliensis**, v.7, p.115-137, 1995.

MODESTO, K. A.; MARTINEZ, C. B. R. Effects of Roundup Transorb on fish: Hematology, antioxidant defenses and acetylcholinesterase activity. **Chemosphere** v.81, p.781-787, 2010.

MONTEIRO, D. A.; ALMEIDA, J. A.; RANTIN, F. T.; KALININ, A. L. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion). **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C, v.143, p.141–149, 2006.

MORAES B. S.; LORO, V. L.; GLUSCZAK L.; PRETTO, A.; MENEZES, C.; MARCHEZAN, E.; DE OLIVEIRA MACHADO, S. Effects of four rice herbicides on some metabolic and toxicology parameters of teleost fish (*Leporinus obtusidens*). **Chemosphere**, v.68, Issue 8, p.1597-601, 2007.

MOURA, F. R.; BRENTGANI, K. R.; GEMELLI, A.; SINHORIN, A. P.; SINHORIN, V. D. G.. Oxidative stress in the hybrid fish jundiara (*Leiarius marmoratus* *Pseudoplatystoma reticulatum*) exposed to Roundup Original®. **Chemosphere**, v.185, p.445-451, 2017.

MYERS, J. P., ANTONIOU, M. N., BLUMBERG, B., CARROLL, L., COLBORN, T., EVERETT, L. G., HANSEN, M., LANDRIGAN, P. J., LANPHEAR, B. P., MESNAGE, R., VANDENBERG, L. N., VOM SAAL, F. S., WELSHONS, W. V., BENBROOK, C. M. Concerns over use of glyphosate-based herbicides and risks associated with exposures: a consensus statement. **Environmental Health**, v.15, n.19, 2016.

NARRA, M. R.; RAJENDER, K.; R. REDDY, R.; MURTY, U. S.; BEGUM, G. Insecticides induced stress response and recuperation in fish: Biomarkers in blood and tissues related to oxidative damage. **Chemosphere**, v.168, p.350-357, 2017.

NASCIMENTO, A. A.; ARAÚJO, F. G.; GOMES, I. D.; MENDES, R. M. M.; SALES, A. Fish gills alterations as potential biomarkers of environmental quality in a eutrophized tropical river in South-Eastern Brazil. **Anatomia, Histologia, Embryologia**, v.41, p. 209-216, 2012.

NEUPARTH, T.; BICKHAM, J. W.; THEODORAKIS, C. W.; COSTA, F. O.; COSTA, M. H. Endosulfan-Induced Genotoxicity Detected in the Gilthead Seabream, *Sparus aurata* L., by Means of Flow Cytometry and Micronuclei Assays. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.76, Issue 2, p.242-248, 2006.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical Biology & Medicine**, v.47, p.469-484, 2009.

NIKI, E.; YOSHIDA, Y.; SAITO, Y.; NOGUCHI, N. Lipid peroxidation: Mechanisms, inhibition, and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.338, p.668-676, 2005.

NOLDIN, J. A.; HERMES, L. C.; ROSSI, M. A.; FERRACINI, V. L. Persistência do herbicida clomazone em arroz irrigado em sistema pré-germinado. 22º Reunião da Cultura do Arroz Irrigado. Balneário Camboriú. Anais... Itajaí: **EPAGRI**, p.363-364, 1997.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SCHARTZMANN, M.; DE ASSIS, H. C. S.; SILVA, P. H.; PELLETIER, E.; AKAISHI, F. M. Evaluation of tributyltin subchronic effects in

tropical freshwater fish (*Astyanax bimaculatus*, Linnaeus, 1758). **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v.51, p.161-167, 2002.

OLIVEIRA RIBEIRO, C. A.; SILVA DE ASSIS, H. C. Chapter 10, AChE inhibition as a biomarker for pollutants contamination in tropical aquatic ecosystems. In: PARVEEN, M.; KUMAR, S. (Eds). **Recent Trends in the Acetylcholinesterase System**. Netherlands, p.103-124, 2005.

OLIVEIRA, A. S.; SANTOS, D. C.; OLIVEIRA, E. N. A.; BRITO, J. G.; SILVA, J. W. L. Qualidade da água para consumo humano distribuída pelo sistema de abastecimento público em Guarabira-PB. **Revista Verde (Mossoró – RN)**, v.7, n.2, p 199-205, 2012.

OSÓRIO, F. H. T.; SILVA, L. F. O.; PIANCINI, L. D. S.; AZEVEDO, A. C. B.; LIEBEL, S.; YAMAMOTO, F. Y.; PHILIPPI, V. P.; OLIVEIRA, M. L. S.; MACHADO, C. F. O.; NETO, F. F.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C.; RIBEIRO, C. A. O. Water quality assessment of the Tubarão River through chemical analysis and biomarkers in the Neotropical fish *Geophagus brasiliensis*. **Environmental Science and Pollution Research**, v.21, p.9145-9160, 2014.

PANDOLFO, C.; BRAGA, H. J.; DA SILVA JR, V. P.; MASSIGNAM, A. M.; PEREIRA, E. S.; THOMÉ, V. M. R.; VALCI, F.V. **Atlas Climatológico do Estado de Santa Catarina**. Florianópolis: Epagri, 2002.

PEREIRA, E. R.; COGO, A. J. D.; CRUZ, Z. M. A. Biomarcadores enzimáticos em *Holothuria grisea* (Selenka, 1867) expostas ao chumbo, cádmio e cobre. **Natureza on line**, v.12, Issue 1, p.1-9, 2014.

PERUZZO, P. J.; PORTA, A. A.; RONCO, A. E. Levels of glyphosate in surface waters, sediments and soils associated with direct sowing soybean cultivation in north pampasic region of Argentina. **Environmental Pollution**, n.156, p.61-66, 2008.

PIANCINI, L. D. S.; GUILOSKI, I. C.; SILVA DE ASSIS, H. C.; CESTARI, M. M. Mesotrione herbicide promotes biochemical changes and DNA damage in two fish species. **Toxicology Reports**, v.2, p.1157-1163, 2015.

PORTAL G1 SC. Poluição do Rio Perequê é causada por estação de tratamento, diz Fatma, 2013. Disponível em: <<http://g1.globo.com/sc/santa-catarina/noticia/2013/01/poluicao-do-rio-pereque-e-causada-por-estacao-de-tratamento-diz-fatma.html>>. Acesso em: 20/03/2018.

PORTAL G1 SC. Mancha escura aparece no mar da Praia de Perequê, em Porto Belo, 2016. Disponível em: < <http://g1.globo.com/sc/santa-catarina/verao/2016/noticia/2016/01/mancha-escura-aparece-no-mar-da-praia-de-pereque-em-porto-belo.html>>. Acesso em: 20/03/2018.

PORTAL G1 SC. Mancha escura volta a aparecer no mar entre Itapema e Porto Belo, 2017. Disponível em: < <https://g1.globo.com/sc/santa-catarina/verao/2017/noticia/2017/01/mancha-escura-volta-a-aparecer-no-mar-entre-itapema-e-porto-belo.html>>.

catarina/noticia/mancha-escura-volta-a-aparecer-entre-itapema-e-porto-belo.ghhtml>. Acesso em: 20/03/2018.

PRATES, A. M. M.; MANZOLLI, J. I.; MARLI A.F.B.; MIRA, M. A. F. B. Hidrografia de Santa Catarina. **GEOSUL**, n.9, 1986.

RASMUSSEN, J. J.; WIBERG-LARSEN, P.; BAATTRUP-PEDERSEN, A.; CEDERGREEN, N.; MCKNIGHT, U. S.; KREUGER, J.; JACOBSEN, D.; KRISTENSEN, E. A.; FRIBERG, N. The legacy of pesticide pollution: An overlooked factor in current risk assessments of freshwater systems. **Water Research**, v.84, p.25-32, 2015.

RAMSDORF, W. A.; GUIMARÃES, F. S. F.; FERRARO, M. V. M.; GABARDO, J.; TRINDADE, E. S.; CESTARI, M. M. Establishment of experimental conditions for preserving samples of fish blood for analysis with both comet assay and flow cytometry. **Mutation Research**, v. 673, n. 1, p. 78-81, 2009.

ROMÃO, S.; DONATTI, L.; FREITAS, M. O.; TEIXEIRA, J.; KUSMA, J. Blood parameter analysis and morphological alterations as biomarkers on the health of *hoplias malabaricus* and *Geophagus brasiliensis*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.49, n.3, p.441-448, 2006.

RONCO, A. E.; MARINO, D. J. G.; ABELANDO, M.; ALMADA, P.; APARTIN, C. D. Water quality of the main tributaries of the Paraná Basin: glyphosate and AMPA in surface water and bottom sediments. **Environmental Monitoring and Assessment**, p.188-458, 2016.

ROSSI, S. C.; SILVA, M. D.; PIANCINI, L. D. S.; RIBEIRO, C. A. O.; CESTARI, M. M.; SILVA DE ASSIS, H. C. Sublethal Effects of Waterborne Herbicides in Tropical Freshwater Fish. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v.87, p.603-607, 2011.

SALBEGO, J.; PRETTO, A.; GIODA, C. R.; MENEZES, C. C.; LAZZARI, R.; NETO, J. R.; BALDISSEROTTO, B.; LORO, V. L. Herbicide Formulation with Glyphosate Affects Growth, Acetylcholinesterase Activity, and Metabolic and Hematological Parameters in Piava (*Leporinus obtusidens*). **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, n.58, p.740-745, 2010.

SANTANA, L. M. B. M.; CAVALCANTE, R.M.; Transformações Metabólicas de Agrotóxicos em Peixes: Uma Revisão. **Orbital: The Electronic Journal of Chemistry**, v.8, Issue 4, p.257-268, 2016.

SANTOS, J. S. M.; MEURER, C. C. B. S.; ATANAZIO, Z. D. Diagnóstico participativo dos recursos hídricos e seus usos da bacia hidrográfica dos rios tijucas, Perequê, bela cruz, santa luzia e inferninho. **Tijucas: Comitê da Bacia Hidrográfica do Rio Tijucas**, 2006.

SANTOS, R.; JOYEUX, A.; BESNARD, A.; BLANCHARD, C.; HALKETT, C.; BONY, S.; SANCHEZ, W.; DEVAUX, A. An integrative approach to assess ecological

risks of surface water contamination for fish populations. **Environmental Pollution**, n. 220, p.588-596, 2017.

SAVI, E. P.; SAKAE, T. M.; CANDEMIL, R.; SAKAE, D. Y.; VALERIM, K.; REMOR, T. Sintomas associados à exposição aos agrotóxicos entre rizicultores em uma cidade no sul de Santa Catarina. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 39, n.1, 2010.

SCHAUMBURG, L. G.; POLETTA, G. L.; SIROSKI, P. A.; MUDRY, M. D. Baseline values of Micronuclei and Comet Assay in the lizard *Tupinambis merianae* (Teiidae, Squamata). **Ecotoxicology and environmental safety** v.84, 99-103, 2012.

SCHLENK, D. Chapter 6 - Pesticide biotransformation in fish. In: **Biochemistry and Molecular Biology of Fishes**, v.6. Mommsen, T. P. & Moon, T. W., (Editors), Amsterdam: Elsevier, 2005.

SCHLENK, D.; CELANDER, M.; GALLAGHER, E.; GEORGE, S.; JAMES, M.; KULLMAN, S.; HURK, P.V.D.; WILLETT, K. Chapter 4 – Biotransformation on fishes. In: **The Toxicology of Fishes**, Giulio R. T. D & Hinton, D. E. (Editors), CRC Press Taylor and Francis Group, Boca Raton, 2008.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, v.31, p.9-15, 1975.

SEDLAK, J. e LINDSAY, R.H. Estimation of total protein bound and nonprotein sulphhydryl groups in tissues with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, v.25, p.192-205, 1968.

SIGNORIN, M.; PEREIRA FILHO, B.; DELFIM, R.; SCHETTINI, C. A. F. Hidrodinâmica e nutrientes inorgânicos dissolvidos no estuário do Rio Perequê, SC. **Braz. J. Aquat. Sci. Technol.**, v.14, Issue 2, p.13-21, 2010.

SILVA DE ASSIS, H. e. **Der einsatz von biomarkern zur summarischen erfassung von Gewasserverschmutzungen**. 1998, 99 f. Tese de Doutorado apresentada na Universidade Técnica de Berlim, Alemanha.

SILVA, D. R. O.; AVILA, L. A.; AGOSTINETTO, D.; BUNDT, A. D. C.; PRIMEL, E. G.; CALDAS, S. S. Ocorrência de agrotóxicos em águas subterrâneas de áreas adjacentes a lavouras de arroz irrigado. **Química Nova**, v.34, n.5, p.748-752, 2011.

SILVA, B. V.; Leal, C. P.; Oliveira, C. I. M. C.; Júnior, J. A.; Bandeira, M. N.; Paixão, T. F. P. Plano Nacional de Recursos Hídricos: Processo de Construção e Conteúdo. Anais Simpósio Nacional de Ciência e Meio Ambiente - **SNCMA**, n. 8, 2017.

SIMONATO, J. D.; FERNANDES, M. N.; MARTINEZ, C. B. R. Gasoline effects on biotransformation and antioxidant defenses of the freshwater fish *Prochilodus lineatus*. **Ecotoxicology**, v.20, p.1400-1410, 2011

SINGH, B., SINGH, K., 2016. Microbial degradation of herbicides. *Critical Reviews in Microbiology*, Issue 2, v.42, p.245–261, 2016.

SIRHSC - Sistema de informações sobre recursos hídricos do estado de Santa Catarina, 2017. Disponível em: <http://www.sirhesc.sds.sc.gov.br/sirhsc/conteudo_visualizar_estatico.jsp?idEmpresa=22&idMenu=966>. Acesso em: 10 nov. de 2017.

SOBJAK, T. M.; ROMAO, S.; NASCIMENTO, C. Z.; SANTOS, A. F. P.; VOGEL, L.; Guimaraes, A. T. B. Assessment of the oxidative and neurotoxic effects of glyphosate pesticide on the larvae of *Rhamdia quelen* fish. **Chemosphere**, n.182, p.267-275, 2017.

SOSBAI - Sociedade sul-brasileira de arroz irrigado. **Arroz irrigado: recomendações técnicas da pesquisa para o Sul do Brasil**. Bento Gonçalves, RS: SOSBAI, 2014.

SPADOTTO, C. A.; GOMES, M. A. F.; LUCHINI, L. C.; ANDRÉA, M. M. Monitoramento do risco ambiental de agrotóxicos: princípios e recomendações. **Embrapa Meio Ambiente**, Jaguariúna, 2004.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. In KEOHAVONG, P.; GRANT, S. G. **Methods in Molecular Biology, Molecular Toxicology Protocols - Humana Press Inc.**, Totowa, v. 291, 2005.

SUBBURAJ, A.; JAWAHAR, P.; JAYAKUMAR, N.; SRINIVASAN, A.; AHILAN, B. Acute toxicity bioassay of Malathion (EC 50%) on the fish, *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) and associated histological alterations in gills. **Journal of Entomology and Zoology Studies**, v.6, Issue 1, p.103-107, 2018.

TABASSUM, H.; DAWOOD, A. Q.; SHARMA, P.; KHAN, J.; RAISUDDIN, S.; PARVEZ, S. Multi-organ toxicological impact of fungicide propiconazole on biochemical and histological profile of freshwater fish *Channa punctata* Bloch. **Ecological Indicators**, n.63, p.359-365, 2016.

TAKASHIMA, F.; HIBIYA, T.; **An Atlas of Fish Histology. Normal and Pathological Features**. Second ed., Kodansha Ltd., Tokyo, 1995.

THINH, N. Q.; PHU, T. M.; DOUNY, C.; PHUONG, N. T.; HUONG, D. T. T.; KESTEMONT, P.; SCIPPO, M. L. Bioconcentration and half-life of quinalphos pesticide in rice-fish integration system in the Mekong Delta, Vietnam. **Journal of Environmental Science and Health, Part B**, v.53, Issue 1, 2018.

TIAN, D.; MAO, H.; LV, H.; ZHENG, Y.; PENG, C.; HOU, S.. Novel two-tiered approach of ecological risk assessment for pesticide mixtures based on joint effects. **Chemosphere**, v.192, p.362-371, 2018.

TUNDISI, J. G.; TUNDISI, T. M. **Recursos hídricos no século XXI**. Oficina de textos, São Paulo, 2011.

VAN DER OOST, R.; BEYER, J.; VERMEULEN, P. E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.13, p.57-149, 2003.

VAN BRUGGEN, A. H. C.; HE, M. M.; SHIN, K.; MAI, V.; JEONG, K. C.; FINCKH, M. R.; MORRIS, J. G. JR. Environmental and health effects of the herbicide glyphosate. **Science of the Total Environment**, n. 616–617, p.255-268, 2018.

VAZZOLER, A. E. A. DE M. Biologia da reprodução de peixes teleósteos: teoria e prática. Maringá, **EDUEM**; São Paulo: **SBI**, p.169, 1996.

VAZZOLER, A. E. A. DE M. Manual de métodos para estudos biológicos de população de peixes. Reprodução e crescimento. Brasília, CNPq – **Programa Nacional de Zoologia**, 106p. 1981.

VERMEULEN, N. P. E. Chapter 2 - Role of metabolism in chemical toxicity. In: **Cytochromes P450: Metabolic and Toxicological Aspects**, Ioannides, C. (Editor). CRC Press, Boca Raton, FL, USA, 1996.

VIARENGO, A.; PONZANO, E.; DONDERO, F.; FABBRI, R. A simple spectrophotometric method for metallothionein evaluation in marine organisms: An application to Mediterranean and Antarctic molluscs. **Marine Environmental Research**, v.44, n.1, p. 69–84, 1997.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; LUNARDELLI, B.; OLIVEIRA, L. F.; CABRERA, L. C.; RISSO, W. E.; PRIMEL, E. G.; MELETTI, P. C.; FILLMANN, G.; MARTINEZ, C. B. R. Multiple biomarker responses in *Prochilodus lineatus* subjected to short-term in situ exposure to streams from agricultural areas in Southern Brazil. **Science of the Total Environment**, v.542, p.44-56, 2016.

VIEIRA, C. E. D.; COSTA, P. G.; CABRERA, L. C.; PRIMEL, E. G.; FILLMANN, G.; BIANCHINI, A.; MARTINEZ, C. B. R. A comparative approach using biomarkers in feral and caged Neotropical fish: Implications for biomonitoring freshwater ecosystems in agricultural áreas. **Science of the Total Environment**, v.586, p.598-609, 2017.

WIJEYARATNE, W. M. D. N.; PATHIRATNE, A. Acetylcholinesterase inhibition and gill lesions in *Rasbora caverii*, an indigenous fish inhabiting rice field associated waterbodies in Sri Lanka. **Ecotoxicology**, v.15, Issue 7, p.609-619, 2006.

WINKALER, E. U.; SILVA, A.G.; GALINDO, H. C.; MARTINEZ, C. B. R. Biomarcadores histológicos e fisiológicos para o monitoramento da saúde de peixes de ribeirões de Londrina, Estado do Paraná. **Acta Scientiarum**, v.23, n.2, p.507-514, 2001.

WREGE, M. S.; STEINMETZ, S.; JÚNIOR, C. R.; ALMEIDA, I. R. Editores Técnicos. Atlas climático da região Sul do Brasil, Estados do Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. **Embrapa**, Brasília, DF, 2012.

YANCHEVA, V. S.; GEORGIEVA, E. S.; VELCHEVA, I. G.; ILIEV, I. N.; VASILEVA, T.A.; PETROVA, S. T.; STOYANOVA, S. G. Biomarkers in european perch (*Perca fluviatilis*) liver from a metal-contaminated dam lake. **Biologia** v.69, n.11, p.1615-1624, 2014.